

SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Sanja Dević Pavlić

**EKSPRESIJSKI PROFIL AMH, AMHR2,
FSHR I AR GENA HUMANIH STANICA
KUMULUSA U PREDVIĐANJU
FERTILIZACIJSKOG POTENCIJALA JAJNE
STANICE**

DOKTORSKI RAD

Rijeka, 2017.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Sanja Dević Pavlić

**EKSPRESIJSKI PROFIL AMH, AMHR2,
FSHR I AR GENA HUMANIH STANICA
KUMULUSA U PREDVIĐANJU
FERTILIZACIJSKOG POTENCIJALA JAJNE
STANICE**

DOKTORSKI RAD

Mentor: Prof. dr. sc. Anđelka Radojčić Badovinac

Rijeka, 2017.
UNIVERSITY OF RIJEKA

DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY

Sanja Dević Pavlić

**HUMAN CUMULUS CELL EXPRESSION
PROFILE OF AMH, AMHR2, FSHR AND AR
GENES IN PREDICTING OOCYTE
FERTILIZATION POTENTIAL**

DOCTORAL THESIS

Rijeka, 2017.

Mentor rada: Prof. dr. sc. Anđelka Radojčić Badovinac

Doktorski rad obranjen je dana _____ na Sveučilištu u Rijeci, Odjel za biotehnologiju, pred povjerenstvom u sastavu:

1. Prof. dr. sc. Krešimir Pavelić, Sveučilište u Rijeci, Odjel za biotehnologiju
2. Prof. dr. sc. Miljenko Kapović, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci
3. Prof. dr. sc. Neda Smiljan Severinski, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci
4. Prof. dr. sc. Anđelka Radojčić Badovinac, Sveučilište u Rijeci, Odjel za biotehnologiju

Hvala

mojoj mentorici prof. dr. sc. Anđelki Radojčić Badovinac na svim savjetima i sveukupnoj pomoći prilikom istraživanja i izrade ovog doktorskog rada te na nesebičnoj podršci koju mi je pružala tijekom cijelog doktorskog studija.

prof. dr. sc. Nedi Smiljan Severinski na pomoći i konstruktivnim prijedlozima tijekom pisanja rada.

dr. sc. Tamari Tramišak Milaković, Lindi Panić Horvat i Kristini Čavlović na dobroj volji i svojoj pomoći bez koje ovog rada ne bi bilo.

mojim kolegama na pomoći i podršci.

mojoj obitelji na podršci i strpljenju.

Pristup dijelu opreme korištene za izradu ovog doktorskog rada omogućen je projektom Sveučilišta u Rijeci „Razvoj istraživačke infrastrukture na Kampusu Sveučilišta u Rijeci“ koji je financiran iz Europskog fonda za regionalni razvoj (EFRR) u iznosu od 180.182.048,91 kn.

SAŽETAK

Temelj uspješnosti medicinski pomognute oplodnje je pravilno sazrijevanje jajnih stanica. Na kvalitetu jajne stanice velik utjecaj ima okruženje u kojem se ona nalazi, tzv. mikrookoliš koji uključuje stanice kumulusa i folikularnu tekućinu. Određivanje pojedinih komponenti tog mikrookoliša koje se jednostavno i brzo mogu detektirati, a koje omogućavaju razlikovanje kvalitete jajnih stanica, doprinijelo bi povećanju uspješnosti metoda pomognute oplodnje. Anti-Müllerov hormon (AMH) je glikoproteinski faktor rasta, koji luče stanice kumulusa. S obzirom na njegovu ulogu u folikulogenezi, ovim je doktorskim radom istražen ekspresijski profil ovog gena, i s njim povezanih receptora (AMHR2, FSHR i AR), te njihova korelacija s kvalitetom jajnih stanica u postupku medicinski pomognute oplodnje, odnosno s morfološkim karakteristikama jajnih stanica, zigota i embrija te njihovim fertilizacijskim potencijalom. U istraživanje je uključeno 129 uzoraka stanica kumulusa i 35 uzoraka folikularne tekućine koji su sakupljeni od ukupno 52 pacijentice u postupku medicinski pomognute oplodnje. Primijenjena je metoda relativne kvantifikacije genskih ekspresija istraživanih gena u stanicama kumulusa, enzimatski pojačani dvostruki imunološki test (ELISA) za određivanje koncentracije AMH u folikularnoj tekućini istog folikula te morfološka analiza jajnih stanica, zigota i embrija invertnom mikroskopijom. Rezultati dobiveni istraživanjem po prvi put ukazuju na negativnu povezanost ekspresije AMH i AR gena u stanicama kumulusa s morfološkom kvalitetom pripadajuće jajne stanice, odnosno s njenom zrelošću. Osim navedenog, istraživanjem je utvrđeno i postojanje korelacija među ekspresijama ispitivanih gena: između FSHR gena i svih ostalih istraživanih gena (AMH, AMHR2 i AR), između AMHR2 i AR gena, te između AMH i AR gena. Dobiveni rezultati pridonose razjašnjenju potencijalne veze AMH (i receptora koji su na direktni ili manje direktni način povezani s ovim hormonom) i morfološke kvalitete jajne stanice. Istraživanjem je potvrđena važnost kompleksa kumulusa i oocyte, odnosno komunikacije između jajne stanice i njenog mikrookoliša, za razvoj kvalitetne oocyte koja je preduvjet za uspješnu oplodnju i razvoj kvalitetnog embrija.

Ključne riječi: Anti-Müllerov hormon (AMH), folikularna tekućina, kvaliteta jajne stanice, morfologija jajne stanice, stanice kumulusa

SUMMARY

The core notion determining the success rate of the medically assisted reproduction is the right growth of the oocytes. The environment, or the so called microenvironment, greatly influences the quality of the oocyte and it includes the cumulus cells and the follicular fluid. Determining the specific components of this microenvironment, which can be easily and swiftly detected, and which enable us to distinguish between good and bad quality oocytes, would contribute to the success rate of the medically assisted reproduction. Anti-Müllerian hormone is a glycoprotein growth factor emitted by the cumulus cells. Considering its role in the folliculogenesis, this doctoral thesis looked into the expression profile of the stated gene and its respective receptors. Their correlation with the oocyte quality in the process of medically assisted reproduction was examined, as well as morphological characteristics of the oocytes, zygotes and embryos together with their fertilization potential. The research included 129 cumulus cells samples and 35 follicular fluid samples which had been harvested from 52 patients during the process of medically assisted reproduction. The method of relative quantification of gene expressions in the cumulus cells for the researched genes was employed, the enzyme - linked immunosorbent assay (ELISA) was used to determine the concentration of AMH in the follicular fluid of the respective follicle, and the morphological analysis of the oocytes, zygotes and embryos was conducted by inverted microscopy. The results obtained in the research for the first time show the negative correlation between the AMH and AR genes expression in the cumulus cells and the morphological quality, i.e. maturity, of the respective egg cell. Furthermore, the research determined the existence of correlations between the expressions of the examined genes as follows: between FSHR genes and all the other researched genes (AMH, AMHR2 and AR), between AMHR2 and AR genes, as well as between AMH and AR genes. The obtained results also contribute to the clarification of the potential connection between AMH (and the receptors directly or less directly linked to this hormone) and morphological quality of the egg cell. The research confirmed the importance of the cumulus - oocyte complex, i.e. of the communication between the egg cell and its microenvironment, for the growth of a high - quality oocyte, which is a prerequisite for a successful fertilization and growth of a high - quality embryo.

Keywords: Anti-Müllerian hormone (AMH), cumulus cells, follicular fluid, oocyte morphology, oocyte quality

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Građa i razvoj jajne stanice	2
1.1.1. Građa jajne stanice	3
1.1.2. Razvoj jajne stanice	6
1.1.2.1. Folikulogeneza	7
1.1.2.2. Oogeneza i mejoza	9
1.2. Mikrookoliš jajne stanice.....	13
1.2.1. Utjecaj mikrookoliša na kvalitetu jajne stanice	13
1.2.2. Folikularna tekućina	16
1.2.2.1. Biljezi kvalitete jajne stanice u folikularnoj tekućini.....	16
1.2.3. Stanice kumulusa.....	17
1.2.3.1. Stanični biljezi kvalitete jajne stanice.....	18
1.3. Morfologija jajne stanice, zigote i embrije i važnost za ishod MPO.....	19
1.3.1. Jajna stanica (0. dan).....	19
1.3.2. Zigota (1. dan).....	23
1.3.3. Embrij (2. i 3. dan).....	24
1.3.4. Blastocista (5. dan)	26
1.4. Anti-Müllerov hormon (AMH) i s njim povezani receptori.....	27
1.4.1. Građa i funkcija anti-Müllerovog hormona.....	27
1.4.2. Receptor anti-Müllerovog hormona tipa II (AMHR2)	31
1.4.3. Receptor folikulstimulirajućeg hormona (FSHR)	32
1.4.4. Receptor androgena (AR).....	33
1.4.5. Povezanost AMH i receptora AMHR2, FSHR i AR	34
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	36
3. ISPITANICI I METODE	38
3.1. Ispitanice	38

3.2. Metode	40
3.2.1. Prikupljanje uzoraka stanica kumulusa	41
3.2.2. Prikupljanje uzoraka folikularnih tekućina	42
3.2.3. Morfološko ocjenjivanje jajnih stanica, oplođenih jajnih stanica i embrija	42
3.2.3.1. Morfološko ocjenjivanje jajne stanice (0. dan)	42
3.2.3.2. Morfološko ocjenjivanje zigote (1. dan)	45
3.2.3.3. Morfološko ocjenjivanje embrija (2. i 3. dan)	47
3.2.4. Izolacija i kvantifikacija RNA iz stanica kumulusa	48
3.2.5. Reverzna transkripcija RNA u cDNA i kvantifikacija dobivene cDNA....	50
3.2.6. Relativna kvantifikacija genske ekspresije AMH, AMHR2, FSHR i AR gena pomoću RT-PCR-a	51
3.2.7. Određivanje koncentracije AMH u folikularnoj tekućini	54
3.3. Statistička obrada podataka	55
4. REZULTATI.....	56
4.1. Morfološko ocjenjivanje jajnih stanica, zigota i embrija.....	56
4.1.1. Morfološko ocjenjivanje jajnih stanica	56
4.1.2. Morfološko ocjenjivanje zigota	56
4.1.3. Morfološko ocjenjivanje embrija	56
4.2. Analiza genske ekspresije AMH, AMHR2, FSHR i AR	57
4.3. Određivanje koncentracije AMH u folikularnoj tekućini	59
4.4. Utjecaj dobi na morfologiju jajne stanice, zigote i embrija, na razinu genske ekspresije AMH, AMHR2, FSHR i AR u stanicama kumulusa te na koncentraciju AMH u folikularnoj tekućini	60
4.5. Utjecaj hormonske stimulacije na morfologiju jajne stanice, zigote i embrija, na razinu genske ekspresije AMH, AMHR2, FSHR i AR u stanicama kumulusa te na koncentraciju AMH u folikularnoj tekućini	62

4.6.	Razlike u genskim ekspresijama AMH, AMHR2, FSHR i AR u stanicama kumulusa s obzirom na morfologiju jajne stanice, zigote i embrija te s obzirom na ishod MPO	65
4.6.1.	Razlike u ekspresijama istraživanih gena s obzirom na morfologiju jajne stanice	66
4.6.2.	Razlike u ekspresijama istraživanih gena s obzirom na morfologiju zigote	67
4.6.3.	Razlike u ekspresijama istraživanih gena s obzirom na morfologiju embrija	68
4.6.4.	Razlike u ekspresijama istraživanih gena s obzirom na ishod MPO	69
4.7.	Razlike u koncentracijama AMH u folikularnoj tekućini s obzirom na morfologiju jajne stanice, zigote i embrija te s obzirom na ishod MPO	70
4.8.	Povezanost koncentracije AMH u folikularnoj tekućini i genske ekspresije AMH, AMHR2, FSHR i AR u pripadajućim stanicama kumulusa.....	71
4.9.	Utvrđivanje korelacija između genskih ekspresija AMH, AMHR2, FSHR i AR u stanicama kumulusa.....	72
5.	RASPRAVA.....	76
6.	ZAKLJUČCI.....	91
7.	LITERATURA.....	93
8.	POPIS KRATICA.....	120
9.	POPIS ILUSTRACIJA	122
10.	ŽIVOTOPIS	125

1. UVOD

Definicija neplodnosti, prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji, podrazumijeva nemogućnost začeća nakon 12 ili više mjeseci redovitih nezaštićenih seksualnih odnosa (Gurunath i sur. 2011, Zegers-Hochschild i sur. 2009). Postoje brojne različite definicije neplodnosti, ali ono što je svima zajedničko jest da se uvijek radi o izostanku začeća kroz određeno vremensko razdoblje, a ovisno o području koje definira neplodnost, određena su različita vremenska razdoblja koja moraju proći u pokušaju začeća (Maheshwari i sur. 2008). Neplodnost se dijeli na primarnu i sekundarnu. Primarnom se neplodnošću smatra nemogućnost postizanja trudnoće određenog para, dok je sekundarna neplodnost nemogućnost začeća nakon prethodno začete trudnoće. Procjenjuje se da je danas neplodno od 8 do 12% parova što neplodnost čini bolešću s visokom prevalencijom (Boivin i sur. 2007). Uzroci neplodnosti su brojni i podjednako zastupljeni između muškaraca i žena: u 30-40% slučajeva uzrok neplodnosti para je povezan s poremećajima kod žene, u 40% kod muškarca, dok je u preostalih 20-30% uzrok kombinacija stanja prisutnih i u muškarca i žene te nepoznati uzroci (Izzo i sur. 2015). Na nemogućnost začeća prirodnim putem utječu brojni čimbenici, kao što su broj seksualnih odnosa, dob žene, pušenje, tjelesna težina, upotreba lijekova, prisutnost infekcija te psihološki faktori (Boivin i sur. 2007, Crosignani i Rubin 2000, Makar i Toth 2002, Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine 2006).

Kako je etiologija neplodnosti vrlo različita, takvi su i načini liječenja koji su što je više moguće prilagođeni specifičnostima pojedinih pacijenata. Uvriježeno je započinjati liječenje jednostavnijim zahvatima i metodama, koji, ukoliko je potrebno, prelaze u sve složenije (Crosignani i Rubin 2000, Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine 2006). Jedna od početnih metoda liječenja kojom se nastoji povećati šansa para za prirodno začeće je određivanje točnog vremena ovulacije (transvaginalnim ultrazvukom ili drugim komercijalno dostupnim metodama) te prema tome tempiranje odnosa. Ukoliko nema uspjeha, nastavlja se s liječenjem i to najčešće postupkom intrauterine inseminacije, tijekom kojeg liječnik ginekolog kateterom ubrizgava prethodno pripravljeno sjeme u ženski spolni sustav, u periovulacijskom razdoblju. Ukoliko se takve jednostavne metode liječenja pokažu neuspješnima predlaže se složenija metoda medicinski pomognute oplodnje (MPO ili ART; eng. *Assisted Reproductive Technology*) (Collins i Van Steirteghem 2004, Crosignani i

Rubin 2000, Izzo i sur. 2015, Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine 2006).

Metode medicinski pomognute oplodnje obuhvaćaju sve postupke kojima se kontrolira i pomaže, ne samo oplodnja jajne stanice, već i transport zametaka, implantacija i razvitak trudnoće. Najpoznatije su IVF (eng. *in vitro fertilisation*), GIFT (eng. *gamete intrafallopian transfer*), ZIFT (eng. *zygote intrafallopian transfer*) ili ICSI (eng. *intracytoplasmic sperm injection*) (Gurunath i sur. 2011, Sadler 2008). Postupci liječenja se mogu obavljati u prirodnom menstruacijskom ciklusu ili u ciklusu uz kontroliranu ovarijsku hiperstimulaciju (KOH). Stimulirani ciklus često započinje hormonskom stimulacijom žene da bi se u konačnici dobilo više jajnih stanica. Nakon stimulacije slijedi postupak aspiracije jajnih stanica tijekom kojeg se sakupljaju jajne stanice iz folikula, a zatim slijedi njihova oplodnja koja se odvija u laboratorijskim uvjetima, s ciljem nastanka barem jednog embrija. Oplodnja oocita odvija se izvan tijela te se tako stvoreni embrij (ili više njih), vraća u žensko tijelo postupkom prijenosa zametka (ET; eng. *embryo transfer*).

Jedan od temelja uspješnosti svih tehnika pomognute oplodnje je pravilno sazrijevanje jedne ili više jajnih stanica (Crosignani i Rubin 2000). Na kvalitetu jajne stanice značajan utjecaj ima okruženje u kojem se ona nalazi, tzv. mikrookoliš koji uključuje stanice kumulusa i folikularnu tekućinu. Definiranje pojedinih parametara tog mikrookoliša koji se jednostavno i brzo mogu detektirati, a koji omogućuju razlikovanje jajnih stanica bolje, odnosno lošije kvalitete, potencijalno bi moglo povećati uspješnost metoda pomognute oplodnje.

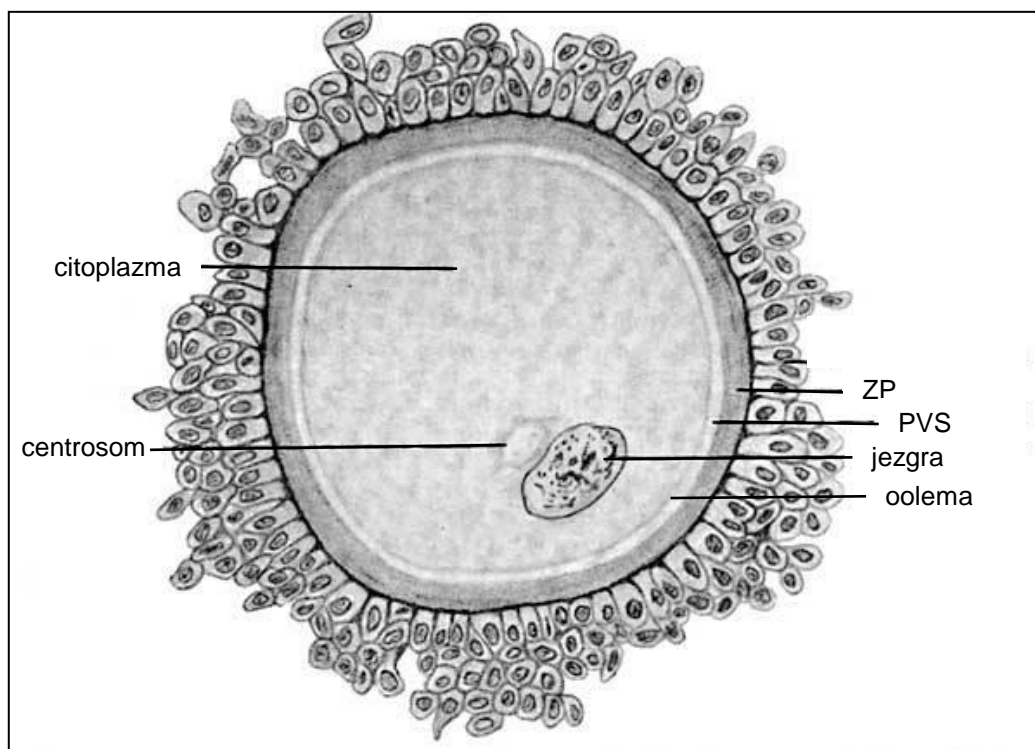
1.1. Građa i razvoj jajne stanice

Ženska spolna stanica, jajna stanica ili oocita, ima ključnu ulogu u nastanku zdravog embrija, a time i u uspješnosti same oplodnje, bilo prirodnim ili medicinski pomognutim putem. Njena kvaliteta je pod utjecajem cijelog niza čimbenika pa tako ovisi o genomu jajne stanice, ali i o okruženju u kojem se ona nalazi, tzv. mikrookolišu. U prirodnom mjesečnom ciklusu žene, razvoj i sazrijevanje jajnih stanica složeni su i visoko kontrolirani procesi koji u konačnici rezultiraju odabirom jedne oocite za

ovulaciju (Rienzi i sur. 2012). U pomognutoj oplodnji, mnogi su od tih prirodnih procesa izbjegnuti hormonskom stimulacijom što dovodi do sazrijevanja i oocita lošije kvalitete (Swain i Pool 2008).

1.1.1. Građa jajne stanice

Osnovni dijelovi jajne stanice su: jezgra, citoplazma s organelima, stanična membrana – oolema, perivitelini prostor (PVS) i zona pelucida (ZP) (Rienzi i sur. 2012) (slika 1).



Slika 1. Prikaz građe zrele jajne stanice. PVS – perivitelini prostor; ZP – zona pelucida. (Prilagođeno iz: Frazer JE. A manual of embryology. Bailliere, Tindall and Cox, London, 1940)

Jezgra zrele jajne stanice sadrži haploidan (n) broj kromosoma koji će stapanjem sa zreloom muškom spolnom stanicom s jednakim brojem kromosoma, dati oplođenu

jajnu stanicu, zigotu, s diploidnim ($2n$) brojem kromosoma. Jezgra se nalazi u iznimno bogatoj citoplazmi, koja sadrži cijeli niz komponenti nužnih za nastavak rasta i razvoja stanice, kao što su proteini, ribosomi, tRNA, mRNA, morfogenetički faktori i razne zaštitne tvari (Rienzi i sur. 2012). Proteini služe kao zaliha energije i aminokiselina koju će koristiti zametak nastao iz jajne stanice. Da bi se osigurala sinteza proteina zametka, nužna je prisutnost ribosoma i tRNA, dok je u mRNA, koja se aktivira tek nakon oplodnje, sadržana uputa za proteine potrebne za rani razvoj zametka. U prilog važnosti kvalitete jajne stanice za pravilan razvoj nastalog embrija govori i postojanje tzv. gena majčinskog učinka (eng. *maternal-effect genes*) iz kojih nastaju mRNA i proteini prisutni u oplođenoj jajnoj stanici prije nego zigota započne s ekspresijom vlastitih gena, a nužni su za rani razvoj embrija (Kaufman i Marlow 2016, Tong i sur. 2000). Ti geni utječu na gensku ekspresiju nastale zigote te na diferencijaciju nastalog embrija, a novija istraživanja navode i njihov učinak na smanjenje kvalitete jajne stanice s porastom životne dobi majke (Lu i sur. 2016). Morfogenetički faktori ili morfogeni su molekule koje omogućuju odvijanje diferencijacije stanica tijekom razvoja zametka. Nalaze se raspoređene po citoplazmi, a za vrijeme razvoja zametka razvrstavaju se po blastomerama. Osim navedenog, citoplazma jajne stanice sadrži i razne zaštitne tvari koje omogućuju preživljavanje nastalog zametka. U citoplazmi jajne stanice smješteni su i ostali stanični organeli: mitohondriji, lizosomi, endoplazmatska mrežica, multivezikularna rezidualna tjelešca, mikrofilamenti i mikrotubuli.

Citoplazma je obavijena staničnom membranom ili oolemom uz koju su u koncentričnim slojevima, raspoređena kortikalna zrnca, sekretorne granule promjera od 0,2 do 0,6 μm . Njihova najvažnija uloga je prevencija polispermije (Liu 2011). Nastaju tijekom ranih faza rasta jajne stanice, kada Golgijevo tijelo raste i prolifirira te počinje stvarati sitne vezikule. Međusobnim stapanjem tih vezikula nastaju zrnca koja migriraju prema oolemi te s vremenom postaju potpuno neovisna o Golgiju. To pomicanje kortikalnih granula pomoću citoskeletnih struktura, jedan je od pokazatelja zrelosti jajne stanice i adekvatne organizacije organela unutar njene citoplazme. Kortikalna zrnca se, neposredno nakon oplodnje, tijekom tzv. kortikalne reakcije, stapaju sa staničnom membranom jajne stanice te otpuštaju svoj sadržaj u izvanstanični matriks koji uključuje perivitelinu prostor, zonu pelucidu i stanice kumulusa. Pri tom dolazi do promjena u cijelom izvanstaničnom matriksu, a posebno

u zoni pelucidi, koja postaje nepropusna za spermije (zonalna reakcija). Osim navedene uloge, sadržaj kortikalnih zrnca nužan je za zaštitu i potporu razvijajućeg zametka u preimplantacijskom razdoblju (Hoodbhoy i Talbot 1994).

Usko uz oolemu, s njene vanjske strane, nalazi se, već spomenuti, perivitelinu prostor. Sintetizira ga sama oocita tijekom oogeneze, a sadržaj i veličina mu se mijenjaju tijekom razvoja jajne stanice kako bi se prilagodio različitim ulogama prije, tijekom i nakon oplodnje (Talbot i Dandekar 2003). Nakon izbacivanja prvog polarnog tijela postaje vidljiv PVS, kada je asimetričnog oblika i povećan oko samog polarnog tijela. Takav izgled zadržava do trenutka oplodnje. Nakon oplodnje i dalje ostaje asimetričan i uvećan oko polarnih tijela, a kako nastupa brazdanje, njegov se izgled mijenja s izgledom blastomera. Dok god je prisutna zona pelucida, prisutan je i PVS, odnosno do nastanka blastociste neposredno prije implantacije. S obzirom na propusnost zone pelucide, sadržaj perivitelinog prostora jednak je sadržaju koji okružuje oocitu. U nezreloj oociti, PVS je vrlo mali i ispunjava ga uglavnom folikularna tekućina, a nakon izbacivanja polarnog tijela, kada dolazi do ekspanzije stanica kumulusa, sintetizira se izvanstanični matriks bogat hijaluronanom, te je PVS ispunjen istim sadržajem. Nakon oplodnje, PVS se značajno povećava, započinje kortikalna reakcija, a sadržaj kortikalnih zrnca otpušta se u PVS pri čemu dolazi do promjena u propusnosti zone pelucide (Hoodbhoy i Talbot 1994). Dio kortikalnih zrnaca ostaje u PVS-u tvoreći novi izvanstanični matriks nazvan omotač kortikalnih zrnaca, koji ostaje nepromijenjen tijekom preimplantacijskog razvoja te nestaje nakon što blastocista izađe iz zone pelucide (Dandekar i Talbot 1992).

Kao što je ranije navedeno, oko perivitelinog prostora nalazi se zona pelucida, glikoproteinska opna građena od vlakana i granula uronjenih u matriks (Papale i sur 2012). U razvoju jajne stanice ZP ima višestruke uloge, kao i u njenoj zaštiti tijekom rasta i transporta, u oplodnji, u vezivanju spermija za oocitu: induciranju akrosomske reakcije u spermija vezanih za ZP i sprječavanju polispermije, te u razvoju blastociste i sprječavanju njene prerane implantacije. Sama oocita i folikularne stanice koje ju okružuju izlučuju ZP, a tvore ju četiri glavna glikoproteina ZP1, ZP2, ZP3 i ZP4. Sva četiri glikoproteina omogućuju vezivanje spermija, a ZP1, ZP3 i ZP4 uključeni su u induciranje akrosomske reakcije vezanih spermija. Razgradnja ZP2 nakon oplodnje sprječava polispermiju (Gupta 2015).

Morfologija oocite jedan je od pokazatelja njene zrelosti i kvalitete te se koristi prilikom MPO za odabir adekvatnih jajnih stanica za oplodnju (Rienzi i sur. 2012).

1.1.2. Razvoj jajne stanice

Sazrijevanje oocite ključno je za uspješnu oplodnju, a obuhvaća dovršavanje prve mejotičke diobe i svih popratnih procesa nužnih za kasniju oplodnju i razvitak embrija, prilikom čega dolazi do koordiniranog sazrijevanja jezgre i citoplazme (Swain i Pool 2008). Dio citoplazmatskog sazrijevanja uključuje i nakupljanje specifičnih molekula iz mikrookoliša jajne stanice unutar oocite što će joj omogućiti pripremu za događaje nakon oplodnje (Sirard i sur. 2006). Te su molekule nužne za poticanje čitave molekularne kaskade koja će u konačnici dovesti do aktivacije genoma embrija i njegovog razvoja do stadija blastociste. Zbog toga se upravo ovo molekularno sazrijevanje jajne stanice smatra najodgovornijim za njen kapacitet da dođe do stadija blastociste pa i dalje (Humblot i sur. 2005, Sirard i sur. 2006).

Zrela jajna stanica postaje spremna za oplodnju kroz paralelno i usklađeno odvijanje folikulogeneze i oogeneze te mejoze (Rienzi i sur. 2012). Dozrijevanje oocite je vrlo kompleksan proces, sa složenom regulacijom, koja započinje tijekom rasta oocite unutar folikula. Pri tom folikuli predstavljaju mikrookoliš oocite te su odgovorni za izlučivanje hormona i faktora rasta uključenih u upravljanje mejozom. Unutar folikula, oocita je u stalnoj interakciji sa stanicama kumulusa koje je okružuju i s granuloza stanicama. Stanice kumulusa osiguravaju joj hranjive tvari, ali i prenose kemijske i molekularne signale kojima se regulira sazrijevanje jajne stanice. Tijekom svog rasta, jajna stanica proizvodi veliku količinu mRNA i proteina, a kako njen rast završava, transkripcija se utišava. Oocite koje su završile s rastom, dovršavaju svoje sazrijevanje pomoću degradacije ili održavanja postojećih proteina. Reverzibilna fosforilacija proteina (pomoću brojnih protein kinaza i fosfataza) potiče aktivaciju ili inaktivaciju proteina i signalnih puteva (Swain i Smith 2007).

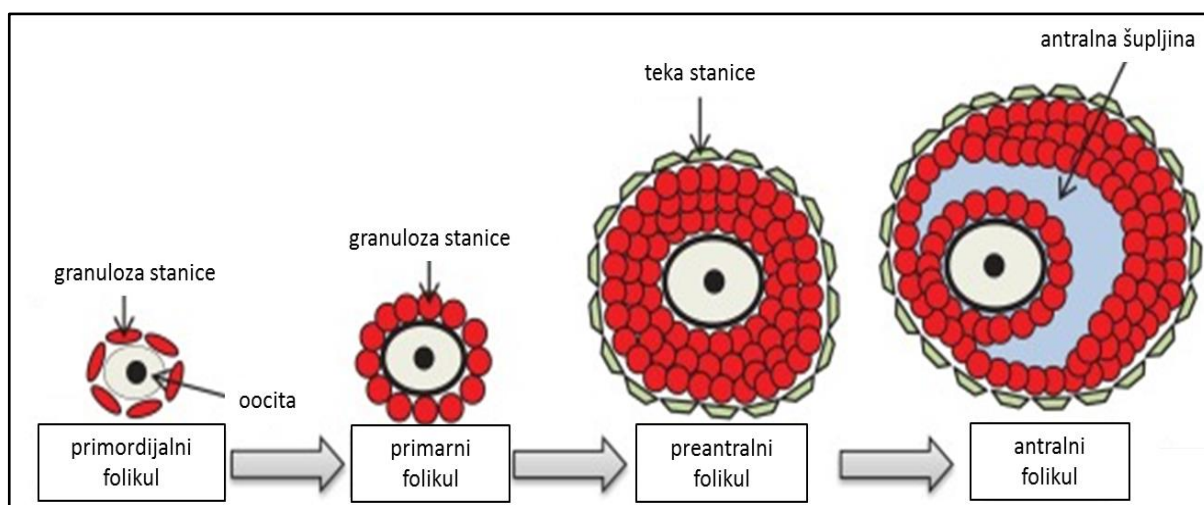
Za nastanak zrele jajne stanice, ali i pripremu maternice za eventualnu trudnoću, nužno je postojanje menstruacijskog ciklusa koji se odvija pod kontrolom cijelog niza hormona. Menstruacijski ciklus se može podijeliti u tri faze na temelju događaja u jajniku (ovarijski ciklus) koji uključuje promjene vezane za folikule i na temelju događaja unutar maternice (uterini ciklus) koji opisuje promjene endometrija (Alexander i sur.

1998, Chabbert Buffet i sur. 1998). Ovarijski se ciklus sastoji od folikularne faze, ovulacije i luteinske faze, dok se uterini ciklus odvija kroz menstruacijsku, proliferacijsku i sekrecijsku fazu. Tijekom folikularne faze ovarijskog ciklusa, dolazi do sazrijevanja folikula koji se pripremaju za ovulaciju, a ova se faza djelomično preklapa s proliferacijskom fazom uterinog ciklusa. Tijekom ovulacije dolazi do otpuštanja jajne stanice iz folikula u jajovod pod utjecajem naglog porasta luteinizirajućeg hormona (LH) (Macklon i Fauser 1998). Ukoliko oplodnja izostane, jajna će stanica propasti, a ukoliko dođe do oplodnje, jajna stanica dovršava sazrijevanje i započinje proces embriogeneze. Nastalom embriju potrebno je oko tri dana da stigne do maternice, te još tri dana za implantaciju u endometrij (Chabbert Buffet i sur. 1998). Do tada je embrij najčešće već u stadiju blastociste. Luteinska faza je zadnja faza ovarijskog ciklusa, a poklapa se sa sekrecijskom fazom uterinog ciklusa. Pod utjecajem folikulostimulirajućeg hormona (FSH) i LH ostaci ovuliranog folikula prelaze u žuto tijelo (lat. *corpus luteum*) koje počne s izlučivanjem progesterona i hormona koji suprimiraju izlučivanje FSH i LH, a što dovodi do degradacije žutog tijela, ukoliko izostane začeće (Macklon i Fauser 1998). Time se smanjuje izlučivanje progesterona što izaziva menstruaciju i početak novog mjesečnog ciklusa. Ukoliko je došlo do začeća, počinje se izlučivati humani korionski gonadotropin (hCG; eng. *human chorionic gonadotropin*), što dovodi do očuvanja žutog tijela. Ono tada nastavlja s izlučivanjem progesterona, a menstruacija je izbjegnuta. Menstruacija je prva faza uterinog ciklusa, a karakterizira ju pojava menstruacijskog krvarenja (Alexander i sur. 1998, Chabbert Buffet i sur. 1998). Slijedi proliferacijska faza tijekom koje dolazi do proliferacije endometrija maternice. Sekrecijska faza je zadnja faza uterinog ciklusa, u kojoj, pod utjecajem progesterona kojeg izlučuje žuto tijelo, dolazi do promjena u endometriju maternice te on postaje pogodan za implantaciju blastociste i potporu rane trudnoće.

1.1.2.1. Folikulogeneza

Folikulogeneza podrazumijeva rast i sazrijevanje folikula koji u sebi sadrži nezrelu oocitu u razvoju, pri čemu se primordijalni razvijaju u velike preovulacijske folikule. Paralelno s proliferacijskom fazom uterinog ciklusa, u jajniku se tijekom folikularne faze odvija folikulogeneza koja završava s ovulacijom, nakon koje u jajniku slijedi luteinska faza koja se poklapa sa sekrecijskom fazom u maternici (Sadler 2008).

Folikuli su odgovorni za izlučivanje hormona i faktora rasta uključenih u upravljanje rastom i razvojem jajne stanice (Sadler 2008). U prirodnom ciklusu, nisu sve oocyte predodređene za ovulaciju - svaki mjesec velik broj njih propadne, dok u stimuliranim ciklusima to nije slučaj (Swain i Pool 2008). Razvojni stadiji folikula započinju s primordijalnim folikulom, preko primarnog, preantralnog i antralnog, do preovulacijskog folikula (Baker 1963) (slika 2).



Slika 2. Razvojni stadiji folikula tijekom folikulogeneze. (Prilagođeno iz: Hannon PR i Flaws JA. The Effects of Phthalates on the Ovary. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2015; 6: 8)

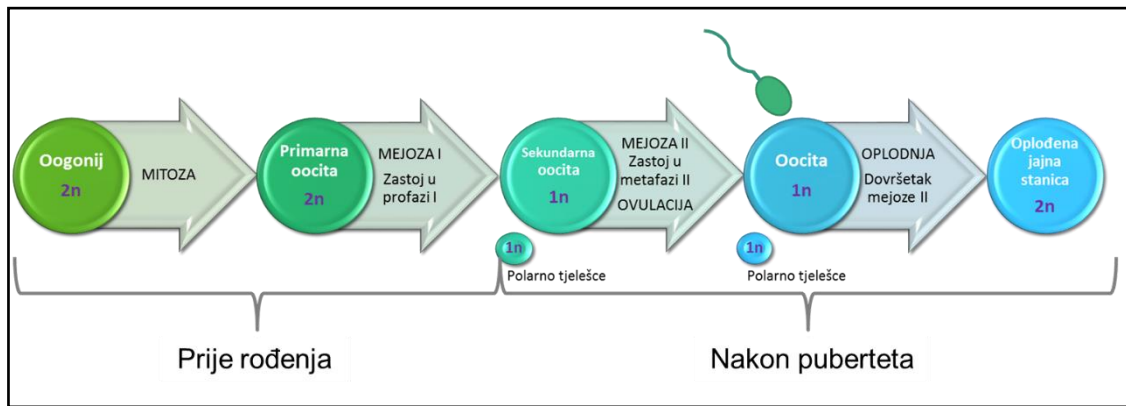
Primordijalni folikuli čine folikularnu rezervu jajnika, a iz njih neprekidnim rastom i razvojem nastaju folikuli višeg razvojnog stupnja (Gougeon i sur. 1994, Hansen i sur. 2008). Njihov je broj najveći u fetalno doba te se, otada, neprekidno smanjuje sve do kraja reproduktivnog života žene. Primordijalni folikuli se sastoje od jajne stanice zaustavljene u profazi prve mejozičke diobe koja je okružena jednim slojem vretenastih folikularnih stanica. Primarni folikuli nastaju diferencijacijom primordijalnih, odnosno rastom jajne stanice te umnožavanjem i diferencijacijom jednog sloja granulosa stanica usko povezanih sa ZP i teka stanica između kojih prolaze krvne i limfne žile (Fortune i sur. 2000, Mescher 2013). Preantralni ili sekundarni folikuli nastaju daljnjom

proliferacijom granuloza i teka stanica oko oocite. Granuloza stanice formiraju se u nekoliko slojeva oko jajne stanice, dok teka stanice diferenciraju u unutarnje (lat. *theca interna*) i vanjske (lat. *theca externa*). Tek stanice nastavljaju svoj razvoj, što će im kasnije omogućiti sintezu androgenih hormona nužnih za sintezu estrogena. Između granuloza i teka stanica formira se barijera nazvana bazalna membrana (Mescher 2013). Preantralni folikuli nastavljaju svoj rast i razvoj prelazeći u antralne ili tercijarne folikule, promjera do 3 mm, u kojima dolazi do stvaranja šupljine među stanicama s nakupljenom folikularnom tekućinom. Granuloza stanice se diferenciraju u muralne (povezane sa stjenkom folikula) i stanice kumulusa (povezane s jajnom stanicom) (Mescher 2013). Daljnjim rastom, antralni folikuli prelaze u preovulacijske ili Graafove folikule koji dosežu promjer od 25 mm. U ovom folikularnom stadiju formira se nakupina stanica nazvana kumulus ooforus, unutar koje se nalazi oocita. Nakon odvajanja kumulusa od stijenke folikula, oocita ostaje okružena koronom radijatom, slojem granuloza stanica koji se nalazi u doticaju sa zonom pelucidom jajne stanice.

Tijekom fetalnog razvoja i ranog djetinjstva, folikuli se razvijaju do ranog antralnog stadija, a početkom menstruacijskog ciklusa, u pubertetu, dolazi do njihovog daljnjeg sazrijevanja pod utjecajem FSH i LH (Messinis 2006). Mehanizmi koji kontroliraju razvoj primordijalnih folikula te način odabira antralnih folikula koji će nastaviti daljnji razvoj nisu u potpunosti razjašnjeni (Baerwald i sur. 2012). Pretpostavlja se da sudbina svakog folikula ovisi o finoj ravnoteži između faktora koji potiču stanični rast, proliferaciju i diferencijaciju i onih koji promoviraju apoptozu.

1.1.2.2. Oogeneza i mejoza

Oogeneza podrazumijeva razvoj jajne stanice, sazrijevanje njene jezgre u mejotičkoj diobi, ali i razvoj citoplazme (slika 3).



Slika 3. Oogeneza – proces razvoja jajne stanice. 2n – diploidan (46) broj kromosoma; 1n – haploidan (23) broj kromosoma.

Mejoza uključuje dvije uzastopne diobe: prvu i drugu mejotičku diobu, tijekom kojih se broj kromosoma prepolovi na haploidan (23 kromosoma) (Cooper i Hausman 2004, Sadler 2008). Mejoza započinje udvostručavanjem DNA, svaka stanica sadrži diploidan broj (46 kromosoma) dvokromatidnih kromosoma. Redukcija broja kromosoma postiže se upravo dvjema uzastopnim diobama, mejozom I i II, nakon samo jedne replikacije DNA. Mejoza I započinje nakon interfaze i replikacije, tijekom koje nastaju dvije identične kromatide svakog kromosoma. Slijedi sparivanje homolognih kromosoma, a zatim njihovo odvajanje u različite stanice - kćeri, dok sestrinske kromatide i dalje ostaju zajedno. Sparivanje homolognih kromosoma omogućuje rekombinaciju između očevih i majčinih kromosoma, odnosno osigurava genetičku varijabilnost novonastalih stanica. Rekombinacija se odvija za vrijeme profaze prve mejotičke diobe. U ovoj fazi homologni su kromosomi tijesno priljubljeni, tvoreći sinaptonemni kompleks. Na mjestima sinapsi dolazi do crossing-overa, odnosno do zamjene odsječaka kromatida, a kromosomi ostaju vezani na mjestima gdje se dogodila izmjena genetičkog materijala (kijazme) i nakon što se sinaptonemni kompleks raspadne. U tom se trenutku svaki homologni kromosomski par (bivalent) sastoji od četiri kromatide s jasno vidljivim kijazmama. Takvi se kromosomi dovršetkom profaze I maksimalno kondenziraju i u metafazi I se poredaju u ekvatorijalnu ravninu. Anafaza I započinje odvajanjem kijazmi te se homologni kromosomi razdvajaju tako da svaki od njih kreće prema suprotnom polu stanice. Svaki od homolognih kromosoma još uvijek je dvokromatidan. Nakon završetka mejoze I, nastale stanice

sadrže po jedan član od svakog para homolognih kromosoma, i dalje dvokromatidan. Odmah nakon citokineze započinje mejoza II. U mejozi II dolazi do razdvajanja sestrinskih kromatida. U konačnici, rezultat mejoze su četiri stanice s haploidnim brojem jednokromatidnih kromosoma.

Sazrijevanje oocita započinje prije rođenja, kada spolne pristanice (primordijalne spolne stanice) migriraju do spolnog nabora genetski ženskog zametka te diferenciraju u oogonije (Mescher 2013, Sadler 2008). Oogonije, s diploidnim brojem kromosoma ($2n$), nekoliko se puta mitotički podijele, a zatim, u trećem mjesecu razvoja zametka, neke od njih nastave svoju diferencijaciju u primarne oocite. Do petog mjeseca razvoja broj oogonija raste i doseže svoj maksimum, da bi tada započelo njihovo propadanje. Do sedmog mjeseca većina oogonija propadne, a sve preživjele primarne oocite ulaze u profazu prve mejotičke diobe. Svaka je od tih oocita sada okružena slojem folikularnih stanica te se nalazi u primordijalnom folikulu. Primarne oocite sadrže 46 dvokromatidnih, djelomično kondenziranih, kromosoma (diploidan broj, $2n$). Njihova jezgra naziva se germinalna vezikula (GV), ima specifičan izgled, velika je i vodenasta (Swain i Pool 2008). One ne nastavljaju odmah mejotičku diobu, već miruju u diplotenu profaze I, te će tako ostati sve do puberteta, odnosno do odabira jednog od folikula za dominaciju, kada oocita nastavlja svoj razvoj. Zastoj u diplotenu profaze prve mejotičke diobe naziva se diktioten (Eppig 2001). Neke od primarnih oocita u ovoj fazi ostaju sve do menopauze. U vrijeme rođenja, ukupni broj primarnih oocita iznosi oko 700 000, do početka puberteta ostaje ih oko 400 000, a manje od 500 ih sazrije tijekom reproduktivnog doba žene. Ovisno o trenutku sazrijevanja, neke oocite u stadiju primarne oocite provedu više, a neke manje vremena. Pretpostavlja se da je stadij primarne oocite najotporniji na eventualna oštećenja uzrokovana okolišnim čimbenicima, premda se učestalost kromosomskih anomalija povećava sa životnom dobi majke, odnosno s povećanjem vremena koje je stanica provela u diktiotenu (Sadler 2008). Nastupanjem puberteta, svaki mjesec, iz primordijalnih nastaje određeni broj primarnih folikula. Njih 15 do 20 nastavlja svoj razvoj, kroz stadije folikulogeneze, te do stadija preovulacijskog ili Graafvog folikula doprije najčešće samo jedan. Nagli porast LH i FSH u krvi potakne sazrijevanje antralnog folikula te dolazi do nastavka prve mejotičke diobe kojom nastaje jedna sekundarna oocita i prvo polarno tijelo ili polocita. Svaka od njih sada sadrži 23 (haploidan broj, n) kromosoma. Pri tome nestaje i germinalna vezikula. Sekundarna oocita sadrži većinu citoplazme,

dok polocita ima samo tanak sloj i smještena je u PVS-u sekundarne oocite, između ooleme i ZP. Sekundarna oocita odmah ulazi u drugu mejotičku diobu te dolazi do novog zastoja, u metafazi II, otprilike 3 sata prije ovulacije.

Završetak mejotičke diobe jajne stanice nakon zastoja u metafazi II pod kontrolom je čimbenika promicanja M faze (MPF; eng. *M-phase promoting factor*) čije visoke razine onemogućuju replikaciju DNA molekule (Heikinheimo i Gibbons 1998). U nekoliko ključnih događaja stanične diobe uključen je MPF: razgradnju jezgre, kondenzaciju kromosoma, preslagivanje citoskeleta i održavanje zastoja transkripcije. Specifični regulator MPF-a jest proto-onkogen *c-Mos*, eksprimiran isključivo u rastućim oocitama (Hashiba i sur. 2001, Heikinheimo i Gibbons 1998). U regulaciji mejoze *c-Mos* ima dvostruku ulogu: kao inicijator mejoze te kao citostatski faktor odgovoran za započinjanje i održavanje zastoja u metafazi II (Hashiba i sur. 2001, Hörmanseder i sur. 2013). U nedostatku *c-Mos*-a ne dolazi do zastoja u metafazi II što dovodi do pojačane partenogenetske aktivacije oocite (Heikinheimo i Gibbons 1998). Osim navedenih molekula, za dovršetak mejotičke diobe i pravilnu oplodnju potrebno je i pravilno osciliranje Ca^{2+} iona: niža razina Ca^{2+} iona dovodi do početka kortikalne reakcije, a viša razina do nastavka mejotičke diobe nakon zastoja (Heikinheimo i Gibbons 1998). Upravo porast unutarstanične koncentracije Ca^{2+} iona, u trenutku oplodnje, signal je za početak aktivacije jajne stanice odnosno za započinjanje niza biokemijskih događaja koji uključuju egzocitozu kortikalnih granula, dovršetak mejotičke diobe, replikaciju DNA molekule i prvu mitotičku diobu nastale zigote (Tomashov-Matar i sur. 2008). Drugu mejotičku diobu oocita će dovršiti samo u slučaju oplodnje, inače će propasti u iduća 24 sata. Za to se vrijeme i prvo polarno tijelo podijeli.

Paralelno s navedenim događajima, tijekom kojih sazrijeva jezgra jajne stanice, dolazi i do sazrijevanja njene citoplazme. Taj je proces manje definiran od same mejoze, a uključuje pravilno smještanje organela, sintezu proteina, post-translacijske modifikacije mRNA nakupljene tijekom oogeneze (Smith 2001).

1.2. Mikrookoliš jajne stanice

Mikrookoliš jajne stanice čine komponente koje su u neposrednom doticaju s njom čitavo vrijeme trajanja njenog rasta i razvoja (Dumesic i sur. 2015). Čine ga, u prvom redu, stanice kumulusa, koje su u uskoj vezi s oocitom i s njom tvore kompleks kumulusa i oocite (COC; eng. *cumulus oocyte complex*). Cijeli COC je do ovulacije smješten unutar folikula koji prati razvoj oocite, a ispunjen je tekućinom bogatom nužnim tvarima za oocitu. Ta folikularna tekućina još je jedna od ključnih komponenti mikrookoliša jajne stanice.

1.2.1. Utjecaj mikrookoliša na kvalitetu jajne stanice

Razvoj kompetentne jajne stanice, koja je sposobna dovršiti mejozu, oploditi se i razviti u zametak, rezultat je složene dvosmjerne signalizacije i parakrine komunikacije između oocite i stanica koje ju okružuju (Dumesic i sur. 2015). Za pravilan razvoj jajne stanice nužan je pravilan razvoj folikula, što podrazumijeva stvaranje promjenjivog unutarfolikularnog mikrookoliša. Veliki udio neuspješnosti tehnika MPO ukazuje na postojanje brojnih utjecaja na kvalitetu jajne stanice, kao što su složeni unutarfolikularni procesi koji kontroliraju dozrijevanje jezgre i citoplazme jajne stanice. U potrazi za boljim pokazateljima kvalitete jajne stanice sve se više istražuju molekule uključene u stanično signaliziranje i metabolizam, a koje su sastavni dio mikrookoliša koji okružuje oocitu. Jajna je stanica u stalnoj interakciji sa somatskim stanicama koje je okružuju te sama izlučuje određene komponente koje određuju njen razvoj. Tako ona za vrijeme folikulogeneze izlučuje proteine iz obitelji transformirajućih faktora beta (TGFB; eng. *transforming growth factor* β) koji djeluju na stanice oko nje, što njih pak potiče na izlučivanje njihovih parakrinih faktora, kao što su aktivini, inhibini i Anti-Müllerov hormon (AMH). Oni djeluju na rast oocite, proliferaciju granulosa stanica te diferencijaciju teka stanica. Ovo dvosmjerno signaliziranje neprekidno se mijenja i prilagođava kako bi omogućilo usklađeni razvoj folikula i dozrijevanje jajne stanice (Dumesic i sur. 2015, Li i Albertini 2013).

Jedan od procesa nužnih za sinkroniziran rast folikula i razvoj jajne stanice u njemu je steroidogeneza (Dumesic i sur. 2015). Radi se o složenom nizu reakcija koji od kolesterola, preko pregnenolona vode do progesterona, prekursora za sintezu androgena i estrogena (Davison i Bell 2006). Androgeni djeluju tako što potiču rast

preantralnih i malih antralnih folikula, putem vlastitog receptora, receptora androgena (AR), pojačavajući gensku ekspresiju receptora folikulostimulirajućeg hormona (FSHR) te inzulinu sličnog faktora rasta 1 (IGF-1; eng. *Insuline-like growth factor 1*) i njegovog receptora u granuloza stanicama, kao i IGF-1 i IGF-1 - receptora u samoj oociti (Dumesic i sur. 2015, Rice i sur. 2007, Vendola i sur. 1998). Sve navedeno dovodi do interakcije rastućeg folikula sa FSH, čimbenicima rasta te čimbenicima koje izlučuje oocita, što potiče diferencijaciju granuloza stanica u muralne i stanice kumulusa u antralnom folikulu (Dumesic i sur. 2015). Pod utjecajem LH, teka stanice počinju stvarati androgen koji FSH-om stimulirane granuloza stanice aromatiziraju u estrogen (Jakimiuk i sur. 1998). Ovaj proces dozvoljava kontinuiranu proizvodnju estradiola, nužnog za pravilan razvoj oocite, neovisnu o razini FSH, koja pada kako folikul nastavlja rast (Tesarik i Mendoza 1997).

Mikrookoliš igra važnu ulogu i u sazrijevanju oocite. Prije ovulacije, oocita se nalazi u diotenu, zastoju u profazi prve mejotičke diobe. U tom je stanju održavaju visoke razine cikličkog adenozin monofosfata (cAMP; eng. *cyclic adenosine monophosphate*) osigurane cijelim nizom interakcija između jajne stanice i stanica kumulusa koje ju okružuju (Dumesic i sur. 2015). Naglim skokom razine LH u prirodnom ciklusu, ili davanjem hCG-a u ciklusima MPO, prekida se zastoj i oocita nastavlja mejozu, a istovremeno dolazi do ekspanzije COC-a. Ekspanzija ili širenje COC-a događa se kada se hijaluronska kiselina, koju izlučuju stanice kumulusa pod utjecajem gonadotropnih hormona, hidratizira te se razmaci između stanica kumulusa povećaju. Širenje kumulusa u preovulacijskom folikulu nužno je za proces ovulacije (Lu i sur. 2013).

Metabolizam jajne stanice također je pod utjecajem faktora iz mikrookoliša koji okružuju jajnu stanicu (Dumesic i sur. 2015). Jedan od glavnih metaboličkih puteva stanice jest glukozni metabolizam. Tijekom luteinizacije rastućeg folikula, glukoza se metabolizira anaerobnom glikolizom, što dovodi do proizvodnje laktata (Sutton-McDowall i sur. 2010). Sama oocita nema veliki kapacitet za metaboliziranje glukoze, već to odrađuju stanice kumulusa, a nastali se piruvat transportira u jajnu stanicu kao izvor energije (Roberts i sur. 2002). Oocita sudjeluje u navedenim događajima tako što potiče ekspresiju glikolitičkih gena u stanicama kumulusa (Seli i sur. 2014). Unutar COC-a, određen dio glukoze ulazi u drugi signalni put koji kontrolira oksidativni status oocite, dok dodatna glukoza služi kao supstrat za proizvodnju hijaluronske kiseline nužne za ekspanziju kumulusa te za stanično signaliziranje (Sutton-McDowall i sur.

2010). Eventualni višak glukoze vodi ka proizvodnji fruktoze i sorbitola koji imaju negativan učinak na kvalitetu jajne stanice. Što se tiče lipidnog metabolizma, oocita tijekom ovulacije pojačava oksidaciju slobodnih masnih kiselina kao učinkovitiji izvor adenozin trifosfata (ATP) od glikolize (Dunning i sur. 2014). Slobodne masne kiseline unutar COC-a ulaze u mitohondrije gdje sudjeluju u proizvodnji ATP-a putem beta-oksidacije. U prisutnosti LH ili hCG, nastaje kortizol, koji potiče ovaj lipidni metabolički put kao izvor energije za nastavak mejotičke diobe, oplodnju i ranu embriogenezu (Simerman i sur. 2015). Povećana razina kortizola unutar folikula, povezana je sa sazrijevanjem jajne stanice te s uspješnošću oplodnje (Dumesic i sur. 2015). Pored pojačanog iskorištavanja glukoze, kisika i piruvata tijekom svog razvoja, oocita u interakciji sa stanicama kumulusa regulira transport aminokiselina i kolesterola nužnih za ostale stanične procese (Seli i sur. 2014). Oocyte s većom pretvorbom aminokiselina *in vitro* imaju lošiji razvojni potencijal (Hemmings i sur. 2013). Oksidativna fosforilacija je metabolički put koji koristi energiju oslobođenu oksidacijom hranjivih tvari za sintezu ATP-a, a odvija se na unutrašnjim membranama mitohondrija. Pri tom se elektroni prenose od molekula koje služe kao donori elektrona, na molekule akceptore elektrona u nizu redoks reakcija, tijekom čega dolazi do oslobađanja energije potrebne za sintezu ATP-a. Energijom oslobođenom od elektrona, koji prolaze kroz enzimski sklop od pet proteinskih sustava, dolazi do prijenosa protona kroz unutarnju membranu mitohondrija. Stvoreni gradijent protona (pH gradijent) daje potencijalnu energiju potrebnu za sintezu ATP-a. Narušena funkcija mitohondrija, može dovesti do reproduksijskog starenja te smanjene kvalitete jajne stanice (Bentov i sur. 2011).

Slobodni radikali, kao što su reaktivni kisikovi i dušikovi radikali (ROS; eng. *reactive oxygen species*; RNS; eng. *reactive nitrogen species*), mogu dovesti do uništenja staničnih makromolekula tijekom folikularnog rasta (Agarwal i sur. 2012). Neuspjeh antioksidacijskih mehanizama obrane protiv nastalog oksidacijskog stresa dovodi do djelovanja slobodnih radikala na regulaciju ravnoteže između oksidacije i redukcije unutar stanice te, posljedično, do smanjenog antioksidacijskog kapaciteta u folikulima te smanjenog fertilizacijskog potencijala jajne stanice (Oyawoye i sur. 2003). Povećane razine ROS-a u folikularnoj tekućini, povezane su s lošijim ishodima postupaka MPO (Bedaiwy i sur. 2012).

1.2.2. Folikularna tekućina

Za vrijeme folikularnog razvoja, kako je već prethodno istaknuto, unutar antralnog folikula dolazi do formiranja šupljine ispunjene tekućinom. Ta folikularna tekućina (FF; eng. *follicular fluid*) čini mikrookoliš unutar kojeg se razvija jajna stanica, a nastaje izlučivanjem granuloza stanica te kao izlučevina krvnog seruma (Gérard i sur. 2002). Sastoji se od različitih proteina, metabolita i iona koji su odraz folikularnog metabolizma, a sastav joj nalikuje krvnom serumu (Angelucci i sur. 2006, Hanrieder i sur. 2008). Sastav FF pruža informacije o stadiju folikularnog razvoja u kojem se oocita nalazi u danom trenutku, a kvaliteta jajne stanice i iz nje nastalog embrija povezani su s prisustvom određenih komponenti unutar folikularne tekućine (Liu i sur. 2007, Twigt i sur. 2012).

1.2.2.1. Biljezi kvalitete jajne stanice u folikularnoj tekućini

Proteinski sastav folikularne tekućine mijenja se kako dolazi do sazrijevanja oocite. Osim analize pojedinačnih proteina, informaciju o kvaliteti jajne stanice sadržane unutar folikula, može pružiti kompletna proteomska analiza pripadajuće folikularne tekućine. Takve se analize najčešće provode upotrebom masene spektrometrije (MS). Do sada provedene proteomske analize pokazale su vrlo složen proteomski sastav folikularne tekućine (Angelucci i sur. 2006, Schweigert i sur. 2006). Sastav većinom odgovara sastavu proteina plazme, no sadrži i brojne specifične proteine uključene u razne metaboličke puteve unutar folikula (Hanrieder i sur. 2008, Kushnir i sur. 2012), kao i proteine uključene u biosintezu, remodeliranje staničnog matriksa te u imunološki odgovor (Ambekar i sur. 2013, Bianchi i sur. 2013, Twigt i sur. 2012).

Metabolomika, za razliku od proteomike, ispituje sastav malih molekula i produkata staničnih procesa te je pod utjecajem trenutnog fiziološkog statusa stanice. Utvrđivanjem metabolomskog sastava folikularne tekućine, također najčešće pomoću MS, moguće je utvrditi optimalni mikrookoliš za razvoj jajne stanice unutar folikula (Nel-Themaat i Nagy 2011). Ustanovljene su razlike u sastavu aminokiselina, ugljikohidrata te masnih kiselina između jajnih stanica koje uspješno, odnosno, neuspješno prolaze proces embriogeneze (Wallace i sur. 2012). Još jedan metabolički pokazatelj kvalitete jajne stanice, odnosno njenog fertilizacijskog i razvojnog potencijal jest i potrošnja

kisika. Ona je povećana tijekom oplodnje i razvoja embrija, no teško je mjerljiva i samim time teško upotrebljiva kao eventualni klinički test (Ruvolo i sur. 2013, Tejera i sur. 2011).

Unatoč tome što je kvaliteta jajne stanice povezana s brojnim citokinima i čimbenicima rasta u folikularnoj tekućini, do sada nije razjašnjeno da li je određivanje nekih od njih značajno za utvrđivanje kvalitete oocite (Dumesic i sur. 2015).

U novije se vrijeme pojavljuju i istraživanja mikro RNA (miRNA), malih RNA molekula (od 20 do 24 nukleotida) koje se nalaze u folikularnoj tekućini te sudjeluju u regulaciji ekspresije gena utječući na posttranskripcijske mehanizme (Osman 2012). U folikularnoj tekućini se miRNA nalaze u slobodnoj formi ili unutar egzosoma koje izlučuju i koriste jajne stanice. Ekspresija miRNA u stanicama kumulusa i u jajnoj stanici može utjecati na DNA metilaciju, apoptozu stanica kumulusa te na oblikovanje izvanstaničnog matriksa (Assou i sur. 2013a). Do sada je utvrđeno više od 200 miRNA u folikularnoj tekućini, a ustanovljene su i razlike u njihovoj ekspresiji u žena sa sindromom policističnih jajnika (Roth i sur. 2014).

1.2.3. Stanice kumulusa

Tijekom folikulogeneze oocita je usko vezana s relativno nediferenciranim granuloza stanicama (Gilchrist i sur. 2008). Kako je prethodno istaknuto, tijekom nastanka antralnog folikula dolazi do diferencijacije granuloza stanice u muralne, koje okružuju zid folikula, i stanice kumulusa koje okružuju jajnu stanicu (Swain i Pool 2008). U prirodnom ciklusu, razvoj jezgre jajne stanice odvija se istovremeno s razvojem korona stanica i stanica kumulusa (Rienzi i sur. 2012). Stanice kumulusa su u bliskom kontaktu s oocitom (tj. s njenim korona stanicama) te s njom tvore, već spomenuti, kompleks kumulusa i oocite. One osiguravaju jajnoj stanici sve što joj je potrebno tijekom njenog razvoja, a razumijevanje prirode i raznolikosti tvari koje se prenose između njih još je uvijek nedostatno (Albertini i sur. 2001). Dvosmjerna komunikacija između stanica kumulusa i jajne stanice omogućava složeno međudjelovanje regulatornih čimbenika nužnih za njihov usklađeni rast i razvoj (Silvestre i sur. 2011). Komunikacija između stanica kumulusa i oocite odvija se putem pukotinskih spojeva (eng. *gap junctions*) koji omogućuju metaboličko i električno usklađivanje navedenih stanica. Osim toga, stanice kumulusa zaslužne su i za prijenos

podražaja potrebnih za održanje i prekidanje zastoja u mejozi te za metaboliziranje glukoze kao i opskrbu piruvatom potrebnim za proizvodnju energije. Kako razvoj oocite napreduje, dolazi do niza složenih događaja na molekularnoj i citoplazmatskoj razini, koji su nužni za kasniju potporu pravilnog embrionalnog razvoja. Taj se proces naziva kapacitacija jajne stanice (Sirard i sur. 2006). Nagli porast LH neposredno prije ovulacije uzrokuje ekspanziju stanica kumulusa što uzrokuje promjenu u komunikaciju između njih i jajne stanice te muralnih stanica (Silvestre i sur. 2011). Sazrijevanjem jajne stanice dolazi do smanjene interakcije među njima kako se prekida njihova komunikacija putem prethodno navedenih spojeva (eng. *gap junctions*) (Norris i sur. 2008). Porastom LH stanice kumulusa stvaraju signale uključene u sazrijevanje oocite, dok istovremeno dolazi do porasta njihove metaboličke aktivnosti te promjena koje vode ka njihovoj ekspanziji i u konačnici ka ovulaciji (Silvestre i sur. 2011).

1.2.3.1. Stanični biljezi kvalitete jajne stanice

Pojačana apoptoza stanica kumulusa i granuloza stanica općenito, povezana je s lošijim ishodom MPO, nepravilnim sazrijevanjem jajne stanice te sa slabijim fertilizacijskim potencijalom oocite (Bencomo i sur. 2006, Høst i sur. 2002). Unatoč tome, određivanje vijabilnosti stanica kumulusa nije se pokazalo kao dobar biljeg kvalitete jajnih stanica (Dumesic i sur. 2015, Warzych i sur. 2013). U posljednje vrijeme pristupilo se određivanju transkriptoma stanica kumulusa, kao neinvazivne metode procjene kvalitete jajne stanice. Geni povezani s izloženošću oksidativnom stresu povezani su sa smanjenim uspjehom oplodnje jajne stanice nakon ICSI metode (Bergandi i sur. 2014). Osim navedenih, ostali geni za koje je utvrđena povezanost s kvalitetom jajne stanice uključuju COX2, GREM1, HAS2 i PTX3 (Cillo i sur. 2007, Dumesic i sur. 2015, Feuerstein i sur. 2012). Istraživani su i brojni geni uključeni u stanično signaliziranje, održavanje homeostaze i metabolizam, no objavljeni rezultati nisu jednoznačni (Dumesic i sur. 2015, Feuerstein i sur. 2012, Wathlet i sur. 2013). Najbolje rezultate do sada pokazalo je istovremeno određivanje ekspresije 12 različitih gena uključenih u metabolizam glukoze, transkripciju, regulaciju gonadotropina i apoptozu, koji u 78% slučajeva točno predviđaju ishod trudnoće (Iager i sur. 2013). Još uvijek, međutim, nisu određeni geni koji bi služili kao biomarkeri kvalitete jajne stanice (Dumesic i sur. 2015). Jedno od novijih istraživanja povezalo je dužinu

telomera stanica kumulusa s kvalitetom jajne stanice, no dobiveni rezultati nisu dovoljno jednoznačni za eventualnu kliničku upotrebu (Cheng i sur. 2013).

1.3. Morfologija jajne stanice, zigote i embrija i važnost za ishod MPO

Morfološka karakterizacija oocite pruža informaciju o njenom razvojnom potencijalu te se uobičajeno koristi za odabir oocita u MPO, no utvrđena morfološka kvaliteta jajne stanice za vrijeme MPO, nije uvijek točna u predviđanju uspješnosti oplodnje i razvojnog kapaciteta zigote (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology 2011, Swain i Pool 2008). Pristup procjenjivanju jajne stanice temeljen isključivo na njenoj morfologiji ne uzima u obzir eventualne intrinzične abnormalnosti te može dovesti do kompromitiranog *in vitro* razvoja embrija, i posljedično, do smanjenog postotka začelih i održanih trudnoća (Swain i Pool 2008).

Morfološka procjena započinje pregledavanjem stanica kumulusa i korona stanica. U zrelim jajnim stanicama ta bi masa stanica trebala izgledati kao proširen sluzni sloj, zahvaljujući aktivnom izlučivanju molekula hijaluronske kiseline koje se umeću između stanica kumulusa i dovode do njihovog razdvajanja (Lu i sur. 2013). Kod pripreme stanice za ICSI, čitav se taj sloj stanica uklanja, radi bolje vidljivosti jajne stanice te njene bolje morfološke procjene.

Za adekvatno morfološko ocjenjivanje iznimno je važno standardiziranje vremena kada se izvodi procjena i to u odnosu na oplodnju (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology 2011). U novije se vrijeme promovira korištenje tehnike kontinuiranog fotografiranja zametaka (eng. *time lapse photography*) koja omogućuje praćenje kinetike njegovog razvoja od oplodnje kroz uočavanje vremenski ovisnih morfoloških promjena (Montag i sur. 2013).

1.3.1. Jajna stanica (0. dan)

Kontrolirana ovarijska hiperstimulacija, kojoj su podvrgnute žene uključene u postupke MPO, dovodi do razvoja oocita različite kvalitete, ponajprije zbog neujednačenog sazrijevanja njihove jezgre i citoplazme (Ebner i sur. 2006).

Ocjenjivanje jajne stanice temelji se na procjeni izgleda COC-a, stupnja zrelosti jezgre, morfologije citoplazme i izgleda ekstracitoplazmatskih struktura (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology 2011, Swain i Pool 2008). Idealno vrijeme za procjenu stupnja sazrijevanja jajne stanice jest nakon uklanjanja stanica kumulusa, a prije same oplodnje (Rienzi i Ubaldi 2009). Oocita se smatra nuklearno zreloom kada je u metafazi druge mejotičke diobe (MII), odnosno kada je prvo polarno tijelo (PB; eng. *polar body*) vidljivo u perivitelinom prostoru što se lako uočava svjetlosnim mikroskopom (slika 4. 1). Ukoliko stanica nije zrela, odnosno ukoliko se nalazi u profazi I (PI), unutar citoplazme će biti vidljiva germinalna vezikula. Ukoliko GV nije vidljiva, a ne uočava se niti PB, stanica se klasificira kao MI, a najvjerojatnije se nalazi negdje između raspada GV i metafaze II (slika 4. 2 i 4. 3).

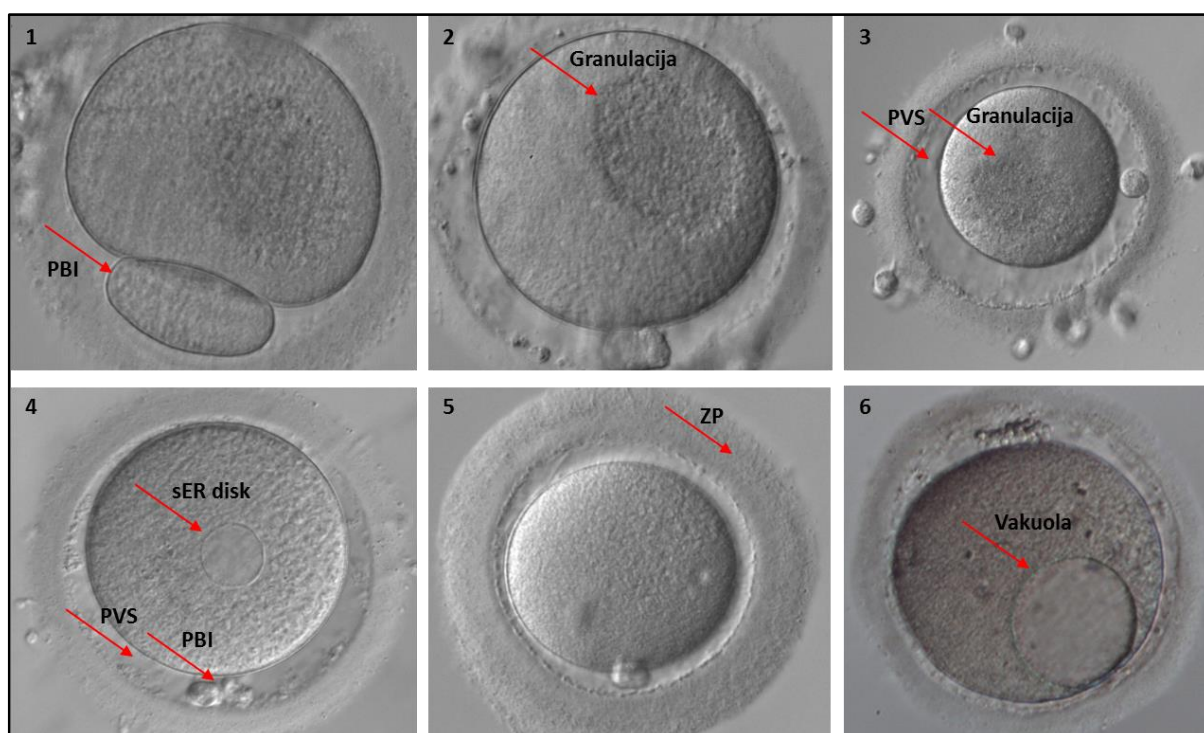


Slika 4. Usporedba morfologije MII, PI i MI oocite. 1 - MII oocita idealne morfologije s vidljivim PBI u perivitelinom prostoru i homogenom citoplazmom; 2 – PI oocita s vidljivom GV; 3 – MI oocita bez vidljivog PBI i GV. PBI – prvo polarno tijelo; GV – germinalna vezikula. (Prilagođeno s URL: <http://atlas.eshre.eu/>)

Dodatne informacije mogu se dobiti mikroskopiranjem pod polariziranim svjetlom pri čemu se na neinvazivan način vizualizira diobeno vreteno, što pruža točniju informaciju o stadiju u kojem se oocita nalazi (Montag i sur. 2011). Oocita mora doseći

određenu veličinu za nastavak mejoze (Otoi i sur. 2000). Prosječni promjer MII oocite može varirati i nije direktno povezan s potencijalnom kvalitetom oplodnje i budućim razvojem embrija (Romão i sur. 2010). Međutim, u oocita čiji je volumen duplo veći od normalnih, vrlo se često radi o poliploidiji što se može potvrditi promatranjem pod mikroskopom gdje se uočavaju dvije GV (Balakier i sur. 2002). Osim veličine, moguće je procijeniti i promjene u obliku oocite i njene zone pelucide, no povezanost tih obilježja s kasnijim anomalijama razvoja embrija nije čvrsto utvrđena (Ebner i sur. 2008).

Osim karakteristika jezgre, uočavanje značajnih promjena ostalih citoplazmatskih struktura (granulacija citoplazme, nakupljanje glatkog endoplazmatskog retikuluma, prisutnost vakuola) i ekstracitoplazmatskih struktura (morfologija prvog polarnog tijela, veličina i izgled PVS, promjene u ZP) može ukazivati na narušeni razvojni i implantacijski potencijal budućeg embrija (Balaban i Urman 2006) (slika 5).



Slika 5. Izdvojene morfološke abnormalnosti oocite. 1 – uvećano prvo polarno tijelo (PBI); 2 – centralna granulacija citoplazme; 3 – veliki perivitelinu prostor (PVS) i granulacija citoplazme; 4 – sER disk u citoplazmi, povećani PVS i fragmentirano PBI; 5 – zadebljala zona pelucida (ZP); 6 – vakuola u citoplazmi. (Prilagođeno s URL: <http://atlas.eshre.eu/>)

Svaka promjena u dozrijevanju citoplazme potencijalno vodi ka poremećaju njene funkcije, a konačni utjecaj na preimplantacijski razvoj jajne stanice ovisi o veličini i broju abnormalnosti (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology 2011). Blaga heterogenost te određen stupanj granulacije u citoplazmi smatra se normalnim. Za razliku od toga, pojava raznih inkluzija i nakupljanja organela u vidu tzv. kondenzirane centralizirane granulacije pokazatelj je slabije kvalitete oocite (slika 5. 2). Jedna od najznačajnijih ozbiljnih abnormalnosti citoplazme je pojava sER (sER; eng. *smooth endoplasmic reticulum*) diskova (slika 5. 4). Iz oocita u kojima su oni uočeni, nastaju embriji čiji je razvoj značajno ugrožen te se takve stanice isključuju iz postupka. Česta je pojava vakuola različite veličine o čemu i ovisi njihov utjecaj na posljedičnu oplodnju (slika 5. 6). Postojanje nekoliko manjih vakuola ne smatra se značajnim, no prisustvo vakuola većih od 14 µm može imati negativan utjecaj na oplodnju. Osim navedenog, kao potencijalni indikator kvalitete oocite navodi se i vizualizacija i karakteriziranje diobenog vretena (Cohen i sur. 2004). Ekstracitoplazmatske karakteristike uključuju promjene vezane za zonu pelucidu, perivitelinu prostor i polarno tijelo. Značajne promjene debljine ili pak potpuno odsustvo zone pelucide vrlo se rijetko uočavaju, dok su blage promjene, koje nisu nužno povezane s kvalitetom oocite, mnogo češće (Ebner i sur. 2010) (slika 5. 5). Veliki PVS uočava se u prezrelim jajnim stanicama, a povezan je s lošijim potencijalom za oplodnju i smanjenom kvalitetom nastalih embrija (Rienzi i sur. 2008) (slika 5. 3). Oocite s netaknutim polarnim tijelom imaju bolje ishode implantacije i trudnoće, a velik utjecaj na njegovo očuvanje ima vrijeme koje je proteklo do izvršenja samog ICSI - postupka (Fancsovits i sur. 2006). Izrazito velika polarna tijela, statistički su značajno povezana s vrlo lošom prognozom (slika 5. 1).

Idealna oocita ima oblik pravilne kugle, okružene ravnomjernom zonom pelucidom, s jednoličnom prozirnom citoplazmom, bez inkluzija te s polarnim tijelom prikladne veličine (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology 2011) (slika 4. 1). Zona pelucida ne smije imati veća odstupanja u boji i debljini, a u PVS-u se ne smiju nalaziti inkluzije i ne smije biti ekstremno povećan. Polarno tijelo također ne smije biti preveliko. Što se tiče citoplazme, ona bi trebala biti homogena, bez nakupljanja organela i postojanja sER diskova. Postojanje nekoliko manjih vakuola ne smatra se značajnim, no veće vakuole

povezane su s negativnim utjecajem na oplodnju. Dobar COC mora imati ekspaniran kumulus i zrakasto raspoređenu koronu.

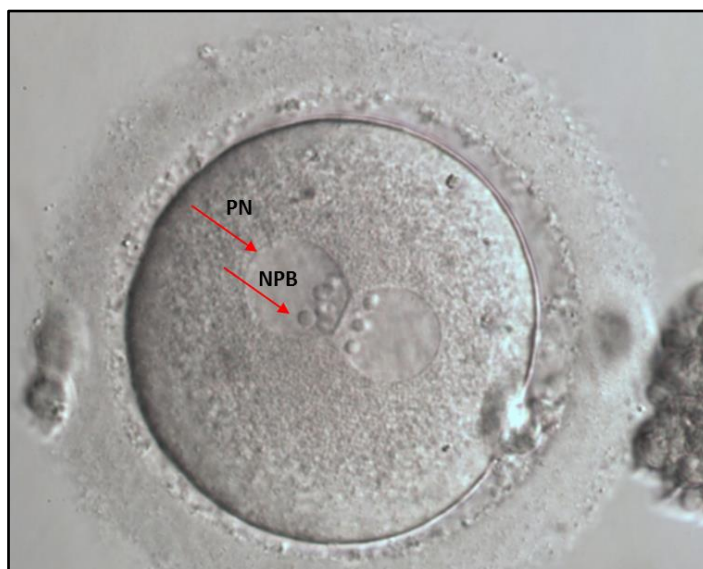
Pojedina morfološka karakteristika, gledana zasebno, teško može jednoznačno ukazivati na kvalitetu jajne stanice, no njena prediktivna vrijednost može se povećati kombiniranjem s morfološkom procjenom kasnijih razvojnih stadija oocite (pronuklearni stadij, stadij embrija i stadij blastociste). Dvije najznačajnije promjene čija samostalna pojava zahtijeva posebnu pažnju jesu gigantske oocite, zbog velike vjerojatnosti poremećaja u genetskom sastavu oocite, i nakupine sER diskova, zbog svojih potencijalno letalnih posljedica na razvoj embrija (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology 2011).

1.3.2. Zigota (1. dan)

Procjena uspješnosti procesa oplodnje uključuje postojanje dva pronukleusa (PN) i dva polarna tijela (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology 2011). Pri tom treba obratiti pažnju na vrijeme koje je proteklo od oplodnje do procjene jer za neke od metoda MPO treba manje, a za neke više vremena za formiranje PN, dok se PB s protokom vremena može raspasti. Nakon procjene uspješnosti oplodnje, procjenjuje se rano stapanje dvaju gameta te rana dioba novonastale zigote. Tu je također ključno vrijeme procjene, koje mora biti standardizirano. Procjena stupnja stapanja gameta 24 sata nakon inseminacije dobar je pokazatelj zrelosti jajne stanice, dok je vrijeme prvog dijeljenja zigote dobar prediktor kvalitete nastalog embrija i njegovog implantacijskog potencijala (Hammoud i sur. 2008, Lawler i sur. 2007). Zigote koje ranije ulaze u prvu diobu pokazuju ujednačenije dijeljenje što je povezano s manjim brojem kromosomskih pogrešaka. Prerano dijeljenje pak (ranije od 20. sata nakon inseminacije), također može biti povezano s lošijom prognozom (Hardarson i sur. 2001). Osim vremena diobe, promatra se i njena pravilnost, te je u zigota koje se dijele direktno u 3 ili više stanica povećana učestalost kromosomskih abnormalnosti (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology 2011). Procjena morfologije pronukleusa uključuje procjenu njihove veličine, simetrije i smještaja, pri čemu je idealno da su podjednake veličine, smješteni blizu jedan drugoga i centralno unutar same stanice. Osim navedenog, promatra se i broj i smještaj nukleolarnih prekursorskih tjelešaca

(NPB; eng. *nucleolar precursor body*) unutar pronukleusa, kojih bi trebalo biti od 5 do 7 s podjednakom distribucijom u svakom PN-u. Ocjenjivanje pronukleusa izvodi se svrstavanjem u 3 kategorije: simetrični, asimetrični ili abnormalni (bez ili samo s jednim NPB-om).

Idealna oplođena oocita trebala bi imati oblik kugle, dva polarna tijela i dva centralno postavljena pronukleusa, smještena jedan uz drugoga, podjednake veličine, s vidljivim membranama i s jednakim brojem, veličinom i razmještajem NPB-ova (slika 6). Pronukleusi ne bi smjeli biti jako razmaknuti, izrazito različite veličine ili iznimno maleni, a sER diskovi ne bi smjeli postojati.



Slika 6. Zigota idealne morfologije s pravilno centralno postavljenim PN-ima normalne veličine, s idealno smještenim NPB-ima adekvatnog broja i veličine te s normalnom citoplazmom. PN – pronukleus; NPB – nukleolarna prekursorska tjelešca. (Prilagođeno s URL: <http://atlas.eshre.eu/>)

1.3.3. Embrij (2. i 3. dan)

Morfološka procjena zametka uključuje ocjenu broja i oblika blastomera, postotka fragmentacije i pregled jezgre (Prados i sur. 2012).

U ocjenjivanju morfologije embrija, važnu ulogu ima procjena jednakosti i brzine njegova dijeljenja. Nejednako dijeljenje vrlo je često u *in vitro* uvjetima, a ima negativan učinak na ishod trudnoće dok je brzina dijeljenja najvažniji pojedinačni parametar morfološke procjene, pri čemu presporo i prebrzo dijeljenje imaju podjednako negativne učinke na implantaciju (Hardarson i sur. 2001, Van Royen i sur. 1999). Presporo dijeljenje može ukazivati na smanjen implantacijski potencijal, dok prebrzo dijeljenje često rezultira nastankom abnormalnosti (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology 2011). Idealno je da drugi dan razvoja embrij ima četiri stanice, a treći dan, osam stanica.

Slijedeća značajka procjene morfologije embrija jest postotak fragmentacije. Fragment je izvanstanična, citoplazmatska struktura, bez jezgre, obavijena membranom, koju je potrebno razlikovati od stanica embrija, dok fragmentacija podrazumijeva pojavu staničnih fragmenata vezanih za membranu, a javlja se za vrijeme ranog razvoja embrija. Njena pojava mora se promatrati u kombinaciji s drugim morfološkim karakteristikama embrija. Određeni postotak fragmentacije embrija je uobičajen, te se tako fragmentacija manja od 10% smatra zanemarivom, dok s povećanjem fragmentacije, raste i pojavnost aneuploidija (Munné 2006, Van Royen i sur. 2001). Fragmentacija manja od 10% označava se kao blaga, od 10 do 25% kao umjerena, dok se fragmentacija veća od 25% smatra jakom. Izražena fragmentacija povezana je s lošijom vijabilnošću zametaka (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology 2011).

Osim navedenog, svaka blastomera mora imati samo jednu jezgru. Pojava multinukleacije, odnosno postojanja blastomere koja sadrži više od jedne interfazne jezgre, povezana je s većim stupnjem kromosomskih aberacija, s nejednakom veličinom stanica, kao i s većim stupnjem fragmentacije (Hardarson i sur. 2001, Van Royen i sur. 2003). Procjena multinukleacije izvodi se 2. dan, a njeno postojanje dovoljno je utvrditi u samo jednoj stanici embrija.

Kao dio morfološke procjene, mogu se pratiti i druge morfološke osobitosti kao što su: citoplazmatska granulacija, izgled membrane te prisutnost vakuola (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology 2011).

Konačno, idealni embrij 2. dana ima četiri stanice jednake veličine, s po jednom jezgrom, s manje od 10% fragmentacije, dok idealni embrij 3. dana ima osam stanica jednake veličine, s po jednom jezgrom, s manje od 10% fragmentacije (slika 7). Normalne embrije karakterizira i nedostatak multinukleacije. Embriji trećeg dana koji imaju više od devet stanica smatraju se „ubrzanima“, oni koji imaju manje od šest, ali su se podijelili u zadnjih 24 sata smatraju se „sporima“, a za one koji se u posljednja 24 sata nisu podijelili smatra se da su u „zastoju“.



Slika 7. Morfološki optimalni embrij 2. i 3. dana. 1 – embrij 2. dana s 4 jednake blastomere, svaka s vidljivom jezgrom i bez fragmentacije; 2 – embrij 3. dana s 8 jednakih, pravilno raspoređenih blastomera, bez fragmentacije.
(Prilagođeno s URL: <http://atlas.eshre.eu/>)

1.3.4. Blastocista (5. dan)

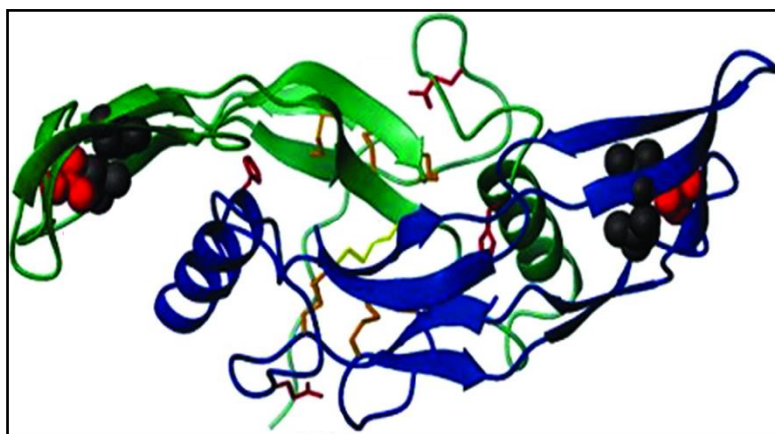
Morfološka procjena blastociste uključuje ocjenjivanje veličine blastocela, unutrašnje stanične mase (ICM; *eng. inner cell mass*) i trofoektoderma (TE) (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology 2011). Idealna bi blastocista trebala imati istaknut, lako uočljiv ICM, sastavljen od velikog broja stanica koje su čvrsto stisnute jedna uz drugu. TE bi se trebao sastojati od mnoštva stanica koje tvore kohezivni epitel. Ocjena blastociste trebala bi uključivati njen stadij razvoja (rana, u širenju, proširena i u izlijevanju/izlegnuta) i ocjenu. U

svakom se stadiju posebno ocjenjuje ICM i TE s ocjenama od 1 do 3, pri čemu je 1 – ocjena dobar, 2 – ocjena uredan, a 3 – ocjena loš.

1.4. Anti-Müllerov hormon (AMH) i s njim povezani receptori

1.4.1. Građa i funkcija anti-Müllerovog hormona

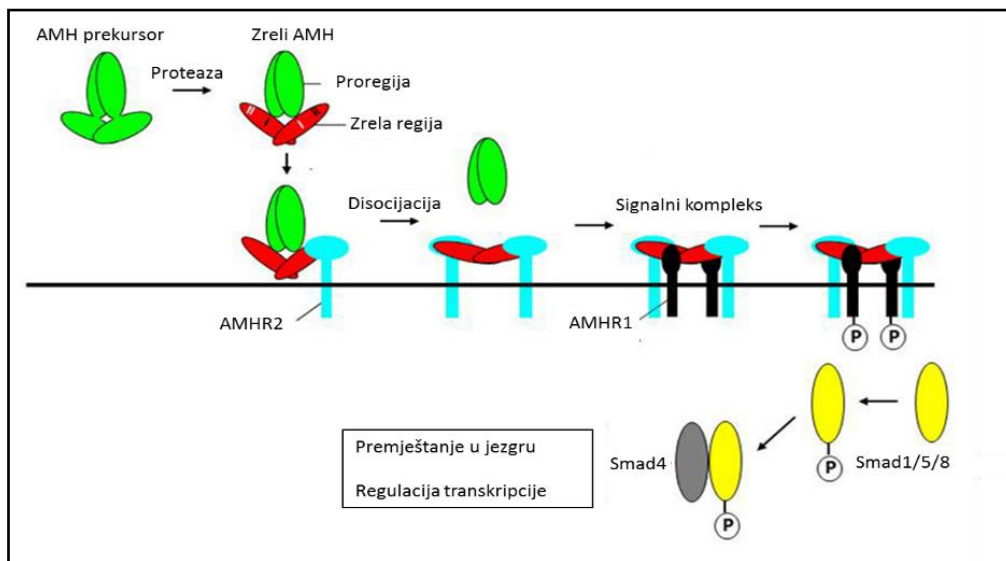
Anti-Müllerov hormon (AMH) je glikoproteinski faktor rasta, član superobitelji transformirajućih faktora rasta β (Cate i sur. 1986). Članovi ove obitelji imaju širok spektar uloga u staničnom rastu, proizvodnji izvanstaničnog matriksa, remodeliranju tkiva te interakcijama između embrionalnog vezivnog tkiva i epitela (Massagué i Chen 2000). Sintetizira se kao veliki prekursor s kratkom signalnom sekvencom. Prije izlučivanja, zreli hormon prolazi proces glikozilacije i dimerizacije tvoreći dimer veličine 144 kDa, građen od dvije identične monomerne podjedinice od 72 kDa međusobno povezane disulfidnim vezama. Svaki monomer ima N-terminalnu domenu (tzv. proregija) i C-terminalnu domenu (tzv. zrela regija) (slika 8).



Slika 8. Trodimenzionalni model C-terminalne domene AMH. (Prilagođeno s URL: <http://humupd.oxfordjournals.org/content/11/4/351/F6.expansion.html>)

Tijekom citoplazmatskog transporta, 5-20% AMH se pocijepa na specifičnom mjestu između N i C-terminalne regije tvoreći dva polipeptida od 58 kDa (proregija) i

12 kDa (zrela regija) (slika 9). Ta dva djela ostaju nekovalentno povezani. Pretpostavlja se da N-terminalna domena potiče aktivnost C-terminalne domene koja je biološki aktivna (Wilson i sur. 1993). Gen koji kodira za AMH smješten je na p kraju kromosoma 19 (Picard i sur. 1986).



Slika 9. Prikaz sazrijevanja i signaliziranja AMH putem receptora tipa 1 i 2.
(Prilagođeno s URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279001/>)

Anti-Müllerov hormon ima važnu ulogu u spolnoj diferencijaciji zametka. U muškom zametku, oko 5. tjedna trudnoće, dolazi do formiranja testisa koji počinju s izlučivanjem testosterona i AMH (Rajpert-De Meyts i sur. 1999). Za izlučivanje AMH odgovorne su Sertolijeve stanice testisa. Za vrijeme embrionalnog razvoja, prije diferencijacije spolnih karakteristika zametka, u oba spola postoje dva para spolnih kanala: Müllerovi i Wolffovi. Izlučivanje AMH od strane Sertolijevih stanica, dovodi do regresije Müllerovih kanala, dok će iz preostalih Wolffovih kanala doći do razvoja dijela muških spolnih organa (pasjemenika, sjemenovoda i mlazničnog voda). Upravo je zahvaljujući ovoj svojoj ulozi AMH i dobio ime. U ženskom zametku, ne dolazi do izlučivanja AMH, te Müllerovi kanali nastavljaju svoj razvoj u dijelove ženskog spolnog sustava (jajovode i tijelo i vrat maternice), dok Wolffovi kanali propadaju.

U muškaraca, AMH izlučuju Sertolijeve stanice tijekom fetalnog razdoblja, od 8. tjedna trudnoće, sve do puberteta kada se proizvodnja AMH smanjuje (Rajpert-De Meyts i sur. 1999). To smanjenje izlučivanja AMH u pubertetu znak je za povećanje koncentracije androgena što dodatno inhibira izlučivanje AMH. Glavna uloga AMH u odraslih muškaraca uključena je u parakrino reguliranje funkcije testisa, pri čemu AMH inhibira aktivnost aromataze u Sertolijevim stanicama, dok u Leydigovim stanicama inhibira proizvodnju testosterona.

U žena AMH izlučuju isključivo granulosa stanice i to od 36. gestacijskog tjedna, sve do menopauze (Lee i sur. 1996). Razvoj folikula u jajniku tijekom reproduktivnog razdoblja žene odvija se ciklički pod kontrolom FSH te čini osnovu menstrualnog ciklusa. Započinje regrutiranjem folikula, nakon čega kreće sazrijevanje primordijalnih folikula, preko primarnih, preantralnih do antralnih. Od nastalih antralnih folikula odabire se jedan, dominantni, koji će nastaviti razvoj do ovulacije (McGee i Hsueh 2000). U žena je AMH eksprimiran u rastućim folikulima, od njihovog ranog razvoja (primordijalni folikuli) do odabira jednog od njih za dominaciju (antralni folikul). Maksimalnu ekspresiju doseže u preantralnim i malim antralnim folikulima (promjera od 4 do 6 mm), dok se u primordijalnim i većim antralnim folikulima njegova razina ne može odrediti (Weenen i sur. 2004). Normalna ekspresija AMH, dakle, podrazumijeva niske razine AMH u primarnim folikulima, postepen rast razina AMH do maksimalnih u velikim preantralnim i malim antralnim folikulima, nakon čega slijedi pad kako folikul nastavlja rast do preovulacijskog folikula (Andersen i sur. 2010, Weenen i sur. 2004). Grøndahl i sur. su, osim navedenog, pokazali da razina AMH ostaje visoka tijekom finalnih stadija folikulogeneze (Grøndahl i sur. 2011). Takav uzorak ekspresije ovog hormona ukazuje na njegovu ulogu u regulaciji broja rastućih folikula te u odabiru folikula za ovulaciju. Istraživanja provedena na AMH deficijentnim miševima ukazuju na to da izlučivanje AMH nije regulirano strogim mehanizmom povratne sprege, već ovisi o intrinzičnoj aktivnosti samog gena za AMH (Visser i sur. 2007). Durlinger i sur. su svojim istraživanjima pokazali da u odsustvu AMH folikuli postaju osjetljiviji na djelovanje FSH. Točnije, za odabir folikula za dominaciju potrebna je određena razina FSH (eng. *FSH threshold*), a što je niža razina AMH to je niža razina FSH dovoljna za odabir rastućeg folikula (Durlinger i sur. 1999, 2001, 2002a, 2002b). Tijekom folikulogeneze AMH je ključan zbog svoje inhibitorne uloge tijekom početne regrutacije primordijalnih folikula te u FSH – ovisnom rastu folikula i odabiru za dominaciju, što

ima utjecaj na povećanje ukupnog broja rastućih folikula, a time i na potencijalno smanjenje kvalitete jajnih stanica u njima (Li i sur. 2014, Seifer i MacLaughlin 2007). U nedostatku AMH, jajnici ranije istroše primordijalne folikule jer dolazi do njihove prerane aktivacije, što i ukazuje na to da bi AMH mogao inhibirati početak rasta folikula (Durlinger i sur. 2002a, McGee i Hsueh 2000). Osim navedenog, kod niske ekspresije AMH, folikuli su osjetljiviji na FSH što omogućava njihov odabir za daljnji rast i ovulaciju (Durlinger i sur. 1999).

U žena je AMH moguće odrediti u serumu, i to od samog rođenja ženskog ploda, kada su njegove razine niske kakve i ostaju sve do nastupanja puberteta (Visser i Themmen 2005). Tada razina serumskog AMH raste te ponovno počinje opadati sa životnom dobi žene, dok ne postane nedetektabilan neko vrijeme prije nastupanja menopauze (Sowers i sur. 2008). Vrijednosti serumskog AMH ostaju stabilne tijekom svih faza menstrualnog ciklusa, a ne mijenjaju se niti pod utjecajem hormonske kontracepcije, stimulacije jajnika, ni trudnoće, što AMH čini dobrim biljegom za predviđanje vremena nastupanja menopauze, odnosno ovarijske rezerve (La Marca i sur. 2013).

Osim već spomenute primjene serumskog AMH za procjenu ovarijske rezerve, odnosno za predviđanje vremena nastupanja menopauze, određivanje razine AMH ima cijeli niz drugih potencijalnih kliničkih primjena. Tako u MPO može pomoći pri individualizaciji protokola hormonske stimulacije jajnika, predviđanju uspješnosti samih postupaka MPO, u postavljanju dijagnoze oligomenoreje ili amenoreje te kao indikator oštećenja ovarijske rezerve (Grynnerup i sur. 2014).

Kao trenutno najbolji biljezi ovarijskog odgovora u postupcima MPO s aspekta osjetljivosti i specifičnosti, potvrđeni su AMH i broj antralnih folikula (AFC; eng. *antral follicle count*), (Broekmans i sur. 2006, Nelson i sur. 2009). Određivanje AMH može dati informaciju o odgovoru jajnika na kontroliranu ovarijsku stimulaciju žena uključenih u postupke MPO, te se ovisno o tome može korigirati sam protokol stimulacije. Određivanje AMH u ove svrhe dovodi do smanjenja broja ciklusa u kojima dolazi do pretjeranog odgovora jajnika, a time i do manjeg broja odustajanja od postupaka te do većeg broja začelih trudnoća i poroda (Yates i sur. 2011). U nekoliko je istraživanja ustanovljena i pozitivna korelacija između razine AMH i broja začelih trudnoća nakon IVF - postupaka (Arce i sur. 2013, Brodin i sur. 2013, Lehmann i sur. 2014).

Posljednja istraživanja predlažu upotrebu određivanja koncentracija AMH u folikularnoj tekućini kako bi se predvidjela uspješnost oplodnje, odnosno implantacijski potencijal embrija (Fanchin i sur. 2007, Kedem-Dickman i sur. 2012, Takahashi i sur. 2008, Tramišak Milaković i sur. 2015). Rezultati provedenih studija su različiti, što ukazuje na potrebu za dodatnim istraživanjem uloge AMH. Fanchin i sur. i Wunder i sur. su pokazali da su visoke koncentracije AMH u folikularnoj tekućini povezane s više implantiranih embrija i većim brojem začelih trudnoća, dok je u radu Kedem-Dickman i sur. ustanovljeno da je veća ekspresija AMH u kumulus stanicama, kao i veća koncentracija u FF velikih preovulacijskih folikula, povezana s lošijom kvalitetom jajnih stanica (Fanchin i sur. 2007, Kedem-Dickman i sur. 2012, Wunder i sur. 2008). Slični su rezultati dobiveni i istraživanjem iz 2011. gdje je utvrđena veća ekspresija AMH u kompaktiranim kumulus stanicama (Grøndahl i sur. 2011).

Pregled literature o vezi AMH s brojem rođenih nakon postupaka MPO proveden je u meta analizi iz 2014. godine te je pokazana blaga pozitivna korelacija (Iliodromiti i sur. 2014). Istim je pregledom utvrđena povezanost AMH s kvalitetom oocite. Provedena istraživanja pokazala su da je koncentracija AMH u folikularnoj tekućini u pozitivnoj korelaciji s fertilizacijskim i implantacijskim potencijalom oocite, te predlažu određivanje koncentracije AMH u folikularnoj tekućini i/ili serumu kako bi se predvidjela uspješnost oplodnje te implantacijski potencijal embrija (Fanchin i sur. 2007, Iliodromiti i sur. 2014, Takahashi i sur. 2008). Međutim, različitim istraživanjima dobiveni su proturječni rezultati: jedni su pokazali da su visoke koncentracije AMH u folikularnoj tekućini povezane s više implantiranih embrija i većim brojem trudnoća (Fanchin i sur. 2007, Honnma i sur. 2013, Nelson i sur. 2009), dok je u drugih utvrđeno da je ekspresija AMH u stanicama kumulusa, kao i koncentracija u folikularnoj tekućini, značajno veća u folikula lošijih jajnih stanica (Kedem-Dickman i sur. 2012, Takahashi i sur. 2008).

1.4.2. Receptor anti-Müllerovog hormona tipa II (AMHR2)

Kao i kod ostalih članova TGF β - superobitelji, i AMH signaliziranje odvija se putem kompleksa serin-treonin kinaznih transmembranskih receptora. Ti se receptori sastoje od međusobno povezanih, ligand-specifičnih receptora tipa II i općenitijih tip I receptora. Za AMH je dosad utvrđeno postojanje 3 različita receptora tipa I (ALK2,

ALK3 i ALK6), no s još uvijek nedovoljno istraženim ulogama i načinima djelovanja (Visser i Themmen 2005). Ligand se veže za receptor tipa II, čime se aktivira receptor tipa I te nastaje heterotetramerični receptorski kompleks. Aktivirani kompleks receptora fosforilira i aktivira citoplazmatske Smad - proteine koji se zatim premještaju u jezgru gdje, izravno i neizravno, utječu na gensku ekspresiju (slika 9).

Dokazano je da AMH koristi iste signalne puteve kao i obitelj koštanih morfogenetskih proteina (BMP; eng. *bone morphogenetic protein*), što znači da je signaliziranje posredovano nizvodnim signalnim molekulama Smad1, 5 i 8 (Jamin i sur. 2002). Tip II receptor (AMHR2) ključan je i za AMH signaliziranje što je dokazano na AMHR2 deficijentnim miševima (Mishina i sur. 1996).

Receptor za AMH tipa II je serin/treonin kinaza, građena od 573 aminokiseline, koje čine izvanstaničnu, transmembransku i unutarstaničnu domenu. Gen koji kodira za AMHR2 smješten je na q kraku kromosoma 12, a sadrži 11 egzona (Imbeaud i sur. 1995). Egzoni 1, 2 i 3 kodiraju signalnu sekvencu i izvanstaničnu domenu, egzon 4 većinu transmembranske domene, a egzoni 5 do 11 unutarstaničnu serin-treonin kinaznu domenu. Gen AMHR2 eksprimiran je u mezenhimalnim stanicama Müllerovih kanala te u gonadama oba spola (Durlinger i sur. 2002b). Na animalnim modelima dokazano je da lokalizacija AMHR2 odgovara lokalizaciji AMH u granulosa stanicama, te da je eksprimiran u stanicama preantralnih i malih antralnih folikula (Baarends i sur. 1995, Durlinger i sur. 2002b, Ingraham i sur. 2000). Specifični uzorci ekspresije AMH i AMHR2 imaju razne uloge u razvoju i funkcijama folikula, kao što su inhibiranje početka rasta primordijalnih folikula i reguliranje osjetljivosti rastućeg folikula na FSH (Durlinger i sur. 2002b).

1.4.3. Receptor folikulstimulirajućeg hormona (FSHR)

Folikulstimulirajući hormon je spolni hormon koji se sintetizira i izlučuje u prednjem režnju hipofize. Zaslužan je za regulaciju rasta i razvoja, pubertetsko sazrijevanje te stimulaciju sazrijevanja spolnih stanica. Razine FSH u muškaraca uglavnom su stalne, dok se u žena mijenjaju tijekom menstruacijskog ciklusa. Po kemijskom sastavu, FSH je glikoproteinski heterodimer koji se sastoji od 2 polipeptidne podjedinice, alfa i beta, obje nužne za biološku aktivnost (Pierce i Parsons 1981). Alfa podjedinica FSH jednaka je onoj od LH, tireotropina (TSH; eng. *thyroid stimulating*

hormone) i humanog korionskog gonadotropina, dok je beta podjedinica specifična te zaslužna za interakciju s FSH - receptorom (FSHR) (Jiang i sur. 2012).

Za funkcioniranje FSH nužan je transmembranski receptor FSHR. Spada u G - protein spregnute receptore (GPCR; eng. *G protein-coupled receptor*), a nalazi se u jajnicima, testisima i maternici. Gen za FSHR nalazi se na p kraku kromosoma 2 (Simoni i sur. 1997). Molekularna masa FSHR iznosi oko 76kDa, a sastoji se od 695 aminokiselina. Kao i svi GPCR ima 7 domena koje se protežu kroz membranu, a koje se dijele na izvanstaničnu, transmembransku (koja se sastoji od sedam uzvojnica) i unutarstaničnu domenu (Costagliola i sur. 2002, Jiang i sur. 2012, 2014). Nakon vezivanja liganda, FSHR mijenja svoju konformaciju, što dovodi do aktivacije transmembranske domene. Prijenos signala aktivira G - protein koji je vezan na drugi kraj receptora (na unutarstaničnu domenu). Dolazi do odvajanja G - proteina od receptora i aktivacije cAMP sustava (Jiang i sur. 2012).

U žena, FSHR je eksprimiran u endometriju maternice za vrijeme sekrecijske faze te u jajniku, u granulosa stanicama, a nužan je za folikulogenezu (La Marca i sur. 2005, Simoni i sur. 1997). U muškaraca FSHR je eksprimiran u Sertolijevim stanicama te ima ulogu u spermatogenezi (Asatiani i sur. 2002). Osim toga, FSHR je eksprimiran i na površini krvnih žila brojnih tumora (Radu i sur. 2010).

Aktivacija FSHR-a potaknuta je estrogenom čije izlučivanje dovodi do povećanja broja receptorskih mjesta na membrani (Jiang i sur. 2012, 2014). Zauzvrat, FSH stimulira granulosa stanice da proizvode estrogen, te njihovo sinergističko djelovanje dovodi do rasta i razvoja folikula u jajniku. Nakon dugotrajnije izloženosti FSH-u, dolazi do fosforilacije unutarstanične domene receptora što uzrokuje odvajanje G - proteina i smanjenu osjetljivost FSHR. Metaboliziranjem FSHR - vezanih mjesta dolazi do smanjenja aktivacije FSHR.

1.4.4. Receptor androgena (AR)

Receptor androgena je vrsta nuklearnog receptora koji se aktivira vezanjem androgenih hormona (testosterona ili dihidrotestosterona) u citoplazmi, nakon čega se premješta u jezgru (Roy i sur. 1999). Djeluje kao transkripcijski faktor koji regulira ekspresiju gena nužnih za razvoj muškog fenotipa (Mooradian i sur. 1987). Gen za AR nalazi se na q kraku kromosoma X (Trapman i sur. 1988). Receptor androgena dolazi

u dvije izoforme: AR-A i AR-B, različitih dužina (Wilson i McPhaul 1994). Kao i većina nuklearnih receptora, građen je od više domena: N-terminalne regulatorne domene, DNA - vezujuće domene, fleksibilne domene (koja povezuje DNA i ligand vezujuće domene), ligand vezujuće domene i C-terminalne domene (Brinkmann i sur. 1989).

Svoje djelovanje AR ostvaruje reguliranjem transkripcije gena. Vezivanje androgena na AR dovodi do njegove konformacijske promjene, što uzrokuje razgradnju proteina toplinskog šoka (HSP; eng. *heat shock proteins*), transport iz citosola u jezgru i dimerizaciju (Heemers i sur. 2007). Nastali se dimer veže za specifičnu sekvencu na DNA molekuli te utječe na transkripciju specifičnih gena. Osim na ovaj način, AR može djelovati na stanicu bez stupanja u interakciju s njenom DNA tako što utječe na citoplazmatske proteine zadužene za prijenos signala, kao što su npr. proteini uključeni u ionski transport (Heinlein i Chang 2002).

U muškaraca, glavni aktivator AR u Wolffovim kanalima je testosteron, dok dihidrotestosteron aktivira AR u urogenitalnom traktu i folikulima kose, što navodi na zaključak da je testosteron zaslužan za razvoj primarnih spolnih karakteristika muškarca, a dihidrotestosteron sekundarnih (Sinisi i sur. 2003). U žena, AR je nužan za razvoj funkcionalnih folikula i ovulaciju čime ima direktan utjecaj na plodnost (Walters i sur. 2010).

1.4.5. Povezanost AMH i receptora AMHR2, FSHR i AR

Ekspresija AMH u stanicama kumulusa statistički je značajno povezana s koncentracijom AMH u folikularnoj tekućini te je u pozitivnoj korelaciji s ekspresijom AMHR2, FSHR i AR (Grøndahl i sur. 2011, Jeppesen i sur. 2013).

Povezanost između AMH i AMHR2 potvrđuje važnost vezivanja receptora i liganda za autokrinu regulaciju AMH u razvoju folikula, dok je povezanost ekspresije AMH i FSHR dokaz postojanja osjetljive ravnoteže unutar folikula između porasta ekspresije FSHR do trenutka odabira folikula te pada ekspresije u folikulima većeg promjera (Nielsen i sur. 2011). Ekspresija AR u stanicama kumulusa pozitivno je povezana s odvijanjem mitoze u granulosa stanicama, dok je utvrđena negativna korelacija s apoptozom istih stanica, što sve upućuje na povećanu ekspresiju AR u „zdravih“ folikula (Vendola i sur. 1998, Weil i sur. 1999). Samim time, pozitivna korelacija između ekspresije AMH i AR ukazuje na mogući značaj AMH za „zdravlje“

folikula i proliferaciju granulosa stanica (Grøndahl i sur. 2011). Dokazana povezanost ekspresija FSHR i AR ukazuje na postojanje utjecaja androgena na rast ranih folikula i sprečavanje atrezije, te utvrđuje nužnost androgena za normalan razvoj folikula (Nielsen i sur. 2011). Nielsen i sur. su dokazali da folikuli ocijenjeni kao zdravi imaju više koncentracije AMH, AR, FSHR, LHR i aromataze; dok su Fanchin i sur. i Takanashi i sur. pokazali da je koncentracija AMH u folikularnoj tekućini u pozitivnoj korelaciji sa fertilizacijskim potencijalom oocite te implantacijskim potencijalom embrija (Fanchin i sur. 2007, Nielsen i sur. 2011, Takahashi i sur. 2008).

Navedene studije upućuju na potrebu za dodatnim istraživanjem ekspresije AMH, AMHR2, AR i FSHR u preovulacijskim folikulima u kontekstu razvojnog potencijala oocite, gdje bi oni mogli služiti kao potencijalni pokazatelji zdravlja folikula i pripadajuće jajne stanice. Grøndahl i sur. su pokazali da folikuli ocijenjeni kao zdravi imaju povećanu ekspresiju svih navedenih gena te predlažu daljnja istraživanja razine njihove ekspresije kako bi se objasnile različite interakcije između oocite i folikula (Grøndahl i sur. 2011).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Osnovni cilj ovog istraživanja bio je utvrditi povezanost ekspresijskog profila gena AMH, AMHR2, FSHR i AR u stanicama kumulusa s kvalitetom jajne stanice, zigote i embrija, procijenjenom na temelju njihovih morfoloških karakteristika.

S obzirom na dokazanu ulogu AMH u folikulogenezi, osnovna pretpostavka istraživanja bila je da ekspresijski profil ovog gena i s njim povezanih receptora (AMHR2, FSHR i AR) u stanicama kumulusa, te koncentracija AMH u folikularnoj tekućini imaju utjecaj na mikrookoliš pripadajuće jajne stanice, odnosno na pravilan razvoj folikula i jajne stanice sadržane u njemu, a što za posljedicu ima nastanak kvalitetne jajne stanice sposobne za oplodnju.

Specifični ciljevi istraživanja bili su sljedeći:

1. Odrediti razinu genske ekspresije AMH, AMHR2, FSHR i AR u stanicama kumulusa u skupini žena uključenih u postupke MPO.
2. Odrediti morfološku ocjenu kvalitete svih uključenih jajnih stanica, zigota i embrija.
3. Ispitati povezanost razine ekspresije svakog od navedenih gena s određenom morfološkom ocjenom kvalitete jajne stanice, zigote i embrija.
4. Ispitati povezanost ekspresijskog profila navedenih gena s dobi uključenih ispitanica.
5. Ispitati povezanost ekspresijskog profila navedenih gena s različitim protokolima hormonske stimulacije kojoj su bile podvrgnute ispitanice.
6. Odrediti koncentraciju AMH u folikularnoj tekućini u podskupini žena uključenih u postupke MPO.
7. Ispitati povezanost koncentracije AMH u folikularnoj tekućini s određenom morfološkom ocjenom kvalitete jajne stanice, zigote i embrija.
8. Ispitati povezanost koncentracije AMH u folikularnoj tekućini s dobi uključenih ispitanica.
9. Ispitati povezanost koncentracije AMH u folikularnoj tekućini s različitim protokolima hormonske stimulacije kojoj su bile podvrgnute ispitanice.
10. Ispitati povezanost koncentracije AMH u folikularnoj tekućini s razinama genske ekspresije AMH, AMHR2, FSHR i AR u stanicama kumulusa.

11. Ispitati međusobnu povezanost genskih ekspresija AMH, AMHR2, FSHR i AR u stanicama kumulusa.
12. Utvrditi da li je na temelju ekspresijskog profila AMH i s njim povezanih receptora (AMHR2, FSHR i AR) u stanicama kumulusa te određenih koncentracija AMH u folikularnoj tekućini, moguće ostvariti predviđanje fertilizacijskog potencijala morfološki optimalnih jajnih stanica.

3. ISPITANICI I METODE

3.1. Ispitanice

U istraživanje su uključene pacijentice koje su se liječile od neplodnosti na Zavodu za humanu reprodukciju, Klinike za ginekologiju i porodništvo, Kliničkog bolničkog centra Rijeka, u periodu od siječnja do prosinca 2015. godine. U istraživanju su sudjelovale ukupno 52 pacijentice uključene u ukupno 58 postupaka MPO (tablica 1). Šest pacijentica je za vrijeme trajanja istraživanja bilo uključeno u dva različita postupka te su, s obzirom na razlike u korištenim protokolima stimulacije, smatrane novim pacijentima. Ukupno je sakupljeno 129 uzoraka stanica kumulusa i 35 uzoraka folikularnih tekućina. Ispitanice su bile dobi od 28 do 45 godina (35.5 ± 4.3 godina), imale su normalne menstruacijske cikluse i indeks tjelesne mase između 18 i 28 kg/m². Žene s endokrinološkim poremećajima (kao što je sindrom policističnih jajnika) nisu uključene u istraživanje.

S obzirom na dokazan utjecaj životne dobi na plodnost žene i kvalitetu njenih jajnih stanica, svi sakupljeni uzorci stanica kumulusa su podijeljeni u dvije grupe: jednu koja je uključivala sve stanice dobivene od pacijentica mlađih od 35 godina ($n = 49$) i drugu koja je uključivala stanice dobivene od pacijentica starih 35 godina ili više ($n = 80$) (Boivin i sur. 2007, Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine 2006).

Sve pacijentice su se liječile postupkom MPO, uz oplodnju oocita mikroinjekcijom spermija, primarno zbog muškog čimbenika neplodnosti. Sve ispitanice potpisale su pristanak za sudjelovanje u ovom istraživanju.

U istraživanje su uključene pacijentice koje su liječene postupkom *in vitro* fertilizacije (uz oplodnju oocite intracitoplazmatskom injekcijom spermija - ICSI) u modificiranom prirodnom ciklusu ili uz hormonsku stimulaciju. Broj dobivenih jajnih stanica po pacijentici razlikovao se sukladno tipu liječenja. Sve pacijentice su primile injekciju korionskog gonadotropina (hCG; 5000 IU i.m.) za završno sazrijevanje jajnih stanica u folikulu, koje su aspirirane 34 do 36 sati nakon injekcije hCG-a. Ukupno 32 pacijentice liječene su u modificiranom prirodnom ciklusu, u kojem se u pravilu za liječenje koristi jedan, spontano razvijen zreli folikul i pripadajuća jajna stanica (tablica

1). U antagonističkom protokolu stimulacije liječene su ukupno 23 pacijentice, koje su uz FSH primale i antagonist oslobađajućeg hormona za gonadotropine (GnRH; eng. *gonadotropin-releasing hormone*). Liječenje subkutanim injekcijama FSH započeto je drugog dana mjesečnog ciklusa, a nakon razvoja folikula srednje veličine (12-14mm) pacijentice su primale i injekcije antagonista GnRH-a, koji kompetitivno blokira djelovanje endogenog GnRH-a, što dovodi do brze supresije izlučivanja gonadotropina (FSH i LH). Ukupno tri pacijentice liječene su u agonističkom dugom ili kratkom protokolu stimulacije, što znači da su primale subkutane injekcije FSH i istovremeno agonist GnRH-a, od drugog dana ciklusa ili od 21. dana prethodnog ciklusa. U ovom tipu liječenja, nakon davanja agonista, dolazi do početnog pojačanog lučenja GnRH i endogenih gonadotropina (FSH i LH), nakon čega slijedi pad lučenja endogenih hormona i tada se započinje stimulacija injekcijama FSH. Prosječan broj aspiriranih oocita u hormonski stimuliranom ciklusu liječenja iznosio je 3.9 ± 2.2 u antagonističkom ciklusu, a u agonističkom 1.7 ± 0.9 .

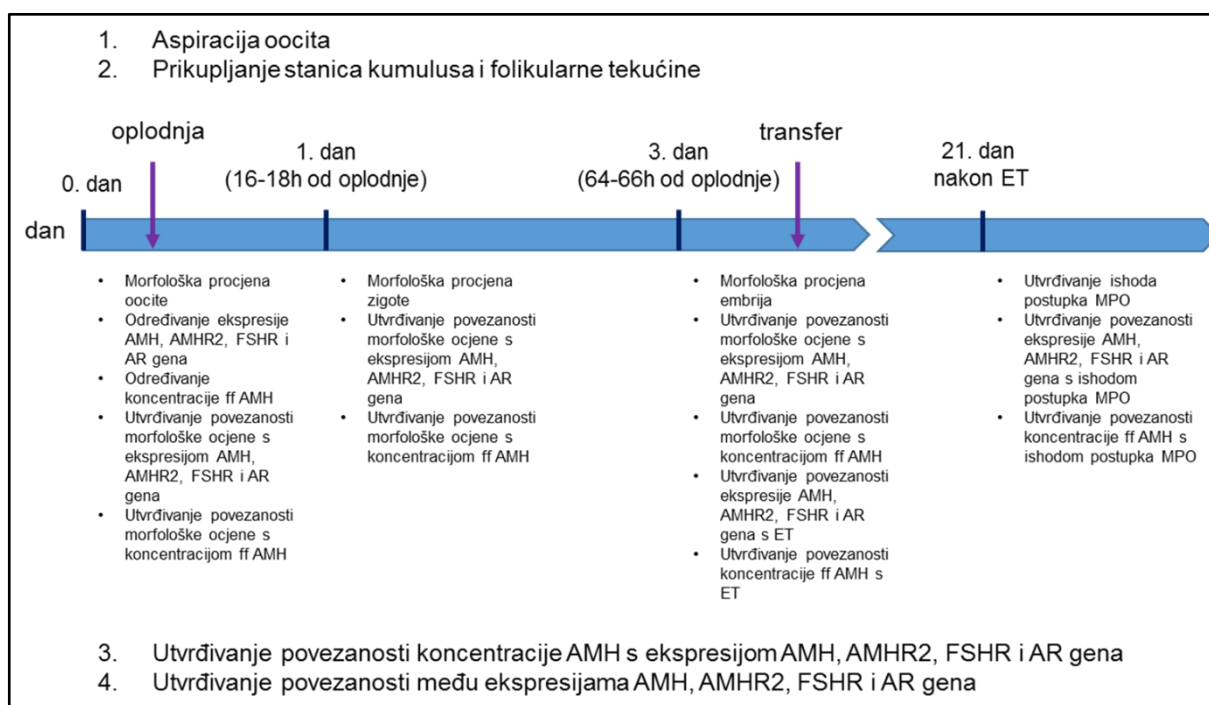
Tablica 1. Ukupan broj uzoraka uključenih u istraživanje.

	Modificirani prirodni ciklus	Agonistički ciklus	Antagonistički ciklus	Ukupno
Ispitanica	32	23	3	58
Oocita	34	90	5	129
Zigota	31	82	4	117
Embrij	27	73	2	102
Transfer	18	23	1	42
Začeće	5	6	0	11
FF	28	6	1	35

MPO - medicinski pomognuta oplodnja; FF – folikularna tekućina

3.2. Metode

Istraživanje je provedeno prema planu istraživanja (slika 10). Ukratko, aspiracijom sadržaja folikula sakupljene su stanice kumulusa i folikularne tekućine iz pripadajućih folikula te su isti dan (0. dan) iz njih izolirane oocyte podvrgnute morfološkoj procjeni. Iz izdvojenih stanica kumulusa izvršena je analiza genske ekspresije AMH, AMHR2, FSHR i AR, a u folikularnoj tekućini određena je koncentracija AMH (ff AMH; eng. *follicular fluid AMH*). Nakon analize, statistički je utvrđena povezanost morfološke ocjene oocyte s ekspresijama istraživanih gena te s koncentracijom ff AMH. Na prikladnim MII oocitama izvršena je oplodnja mikroinjekcijom spermija te je, 16 do 18 sati od oplodnje (1. dan), provedena morfološka procjena oplođene jajne stanice – zigote, nakon čega je statistički utvrđena povezanost njene morfologije s ekspresijama istraživanih gena te s koncentracijom ff AMH. Treći dan nakon oplodnje (nakon 64 do 66 sati) morfološki su procijenjeni nastali embriji te je također utvrđena povezanost njihove morfologije s ekspresijama istraživanih gena te s koncentracijom ff AMH. Nakon morfološke procjene embrija izvršen je prijenos zametka (ET), te je utvrđena povezanost izvođenja ET s ekspresijama istraživanih gena te s koncentracijom ff AMH. Određivanjem serumskog beta hCG-a, tri tjedna nakon ET, utvrđena je eventualno začeta biokemijska trudnoća koja je smatrana krajnjim ishodom postupka MPO. Statistički je utvrđena povezanost ishoda MPO s ekspresijama istraživanih gena te s koncentracijom ff AMH. Osim navedenog, neovisno o vremenu, određena je statistička povezanost koncentracije ff AMH s ekspresijom svakog od istraživanih gena, kao i međusobna povezanost ekspresije svakog od gena.



Slika 10. Planirana metodologija istraživanja s vremenskom linijom izvođenja.

ff AMH – AMH u folikularnoj tekućini; ET – prijenos zametka; MPO – medicinski pomognuta oplodnja.

3.2.1. Prikupljanje uzoraka stanica kumulusa

Aspiracija oocita učinjena je pod kontrolom ultrazvuka (Aloka Prosound 2, Aloka Co. Ltd., Tokyo, Japan), transvaginalno, iglom za punkciju (Cook Ova-stiff, Cook Medical, Australija), na Zavodu za humanu reprodukciju, Klinike za ginekologiju i porodništvo, Kliničkog bolničkog centra Rijeka. Aspirirani sadržaj izliven je u sterilne Petrijeve zdjelice te su u bezprašnoj komori (IVF Workstation L126, K-Systems Kivex Biotec A7S, Birkerød, Danska), na radnoj plohi zagrijanoj na 37 °C, pod stereomikroskopom (Nikon SMZ 800, Japan) pronađeni kompleksi kumulusa i oocite. Kumulus stanice pripadajuće oocite enzimatski su i mehanički izolirane pomoću 50 µl hijaluronidaze (Hyaluronidaza, Cook Medical, Australija) dodane u hranilište za oplodnju (Fertilization Medium, Cook Medical, Australija). Slijedila je inkubacija u CO₂ inkubatoru (Heracell 240i, Thermo Fisher Scientific, SAD) kroz 3 minute, tijekom koje je došlo do aktivacije dodanog enzima. Zatim su uslijedila tri uzastopna provlačenja COC-a kroz otopinu hijaluronidaze, pomoću braunile i šprice od 1 ml, te ispiranje COC-

a nekoliko puta u samom hranilištu. Uklanjanje stanica kumulusa izvedeno je mehanički, provlačenjem oocite kroz striper s nastavcima od 170 i 130 μm (Striper Tips, Cook Medical, Australija). Očišćene oocite isprane su u hranilištu za spolne stanice (Gamete Buffer, Cook Medical, Australija) i odvojene, svaka zasebno, u hranilišta za oplodnju pod uljem (Culture Oil, Cook Medical, Australija). Petrijeve zdjelice s oocitama čuvane su u CO_2 inkubatoru kroz 30 min, na 37 °C i 6% CO_2 . Stanice kumulusa su nakon izolacije isprane s 1 ml otopine soli puferirane fosfatom (PBS tablete, Gibco, Thermo Fisher Scientific, SAD; otopljene u 500ml destilirane vode) i centrifugirane 5 minuta brzinom od 300g (Mini Spin Microcentrifuge, Eppendorf, Njemačka). Supernatant je zatim uklonjen, a na talog stanica je dodan inhibitor ribonukleaza (RNaza), beta-merkaptioetanol (βME) (2-Mercaptoethanol, Sigma-Aldrich, Njemačka), nakon čega su stanice zamrznute na -20 °C do analize.

3.2.2. Prikupljanje uzoraka folikularnih tekućina

Folikularna tekućina iz 35 folikula različitih pacijentica aspirirana je zasebno, izlivena u sterilnu Petrijevu zdjelicu gdje je, u bezprašnoj komori na ploči zagrijanoj na 37 °C, pod stereomikroskopom, tražen kompleks kumulusa i oocite. U istraživanje su uključene samo folikularne tekućine u kojima je pronađen COC te se sa sigurnošću moglo utvrditi da je identificirani COC pripadao izdvojenoj folikularnoj tekućini. Na ovaj smo način bili u stanju iz istog folikula izdvojiti folikularnu tekućinu, stanice kumulusa i jajnu stanicu. Nakon izdvajanja COC-a, folikularna je tekućina odvojena u mikroepruvete i centrifugirana 15 minuta na 200g (Mini Spin Microcentrifuge, Eppendorf, Njemačka) da bi se izdvojili stanični elementi. Nakon uklanjanja taloga, dobiveni je supernatant zamrznut na -20 °C do analize.

3.2.3. Morfološko ocjenjivanje jajnih stanica, oplođenih jajnih stanica i embrija

3.2.3.1. Morfološko ocjenjivanje jajne stanice (0. dan)

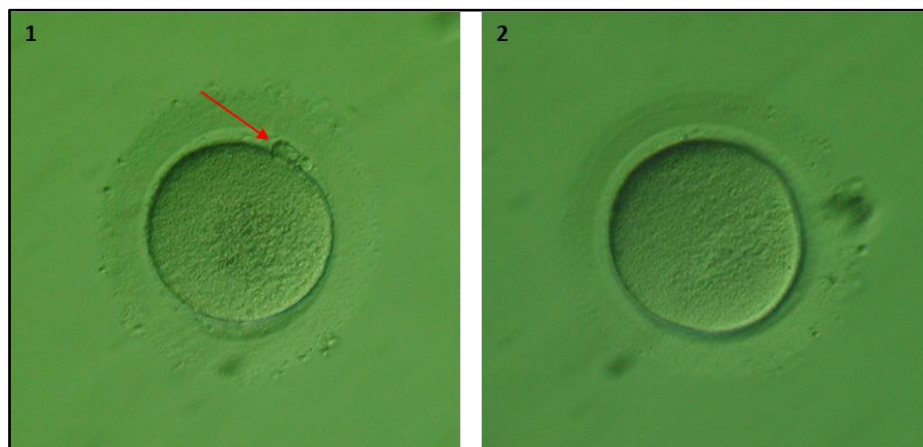
Neposredno prije mikroinjekcije spermija u oocitu, pod invertnim mikroskopom, pri povećanju 200x (Olympus IX51, Tokyo, Japan), analizirana je zrelost očišćenih oocita, pri čemu je, prema njihovim morfološkim karakteristikama, svakoj dodijeljena

ocjena. Mikroinjekcija spermija učinjena je samo na zrelim oocitama za koje je utvrđeno da se nalaze u metafazi druge mejotičke diobe (MII oocyte). Karakteristike na temelju kojih je oocita klasificirana kao MII, MI, PI ili atretična navedene su u tablici 2. Primjer MII i MI oocyte prikazan je na slici 11.

Tablica 2. Procjena zrelosti oocyte.

Procijenjena zrelost oocyte	Karakteristike
MI oocyte	Prvo PB vidljivo u PVS
MI oocyte	Nije vidljiva germinalna vezikula, niti prvo PB
PI oocyte	Germinalna vezikula vidljiva unutar citoplazme
Atretična oocyte	Razgrađena ZP ili tamna, vakuolizirana citoplazma

PB – polarno tijelo; PVS – perivitelinini prostor; ZP – zona pelucida



Slika 11. Ogledni primjer MII i MI oocyte. 1 – MII oocita (prvo PB vidljivo u PVS); 2 – MI oocita (nije vidljivo PB); PB – polarno tijelo; PVS – perivitelinini prostor.

Oocyte koje su ocijenjene kao MII oocyte, podvrgnute su dodatnoj, detaljnijoj morfološkoj analizi te su im procijenjena sljedeća obilježja: izgled perivitelinog prostora, prisutnost inkluzija, izgled prvog polarnog tijela, nakupljanje organela u citoplazmi, prisutnost sER diskova te prisutnost vakuola. Ovakvo ocjenjivanje učinjeno je isključivo u istraživačke svrhe te nije dio rutinskog laboratorijskog protokola kojim se izdvajaju MII oocyte prikladne za daljnju oplodnju.

Na temelju smjernica donesenih Istambulskim konsenzusom pregledavane su sljedeće karakteristike koje daju informaciju o optimalnosti oocyte (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology 2011):

1. Prikladna veličina PVS (ne smije biti ekstremno povećan),
2. Nepostojanje inkulzija u PVS-u,
3. Prikladna veličina prvog polarnog tijela (ne smije biti preveliko),
4. Citoplazma bez nakupljanja organela,
5. Citoplazma bez sER diskova te
6. Citoplazma bez većeg broja ili vakuola uvećanih dimenzija.

Na temelju navedenih karakteristika, MII oocitama dodijeljene su ocjene od 1 do 3 (tablica 3). Primjeri morfološki različito ocjenjenih MII oocita prikazani su na slici 12.

Tablica 3. Ocjenjivanje MII oocita.

Ocjena MII oocyte	Karakteristike
1	Zadovoljavajuća morfologija svih 6 karakteristika*
2	1 od 6 karakteristika* nezadovoljavajuće morfologije
3	2 ili više karakteristika* nezadovoljavajuće morfologije

* - prethodno navedene u tekstu



Slika 12. Ogledni primjer morfološki različito ocjenjenih MII oocita. 1 – MII oocita ocjenjena ocjenom 1 (zadovoljavajuća morfologija svih promatranih karakteristika); 2 – MII oocita ocjenjena ocjenom 2 (centralna granulacija u citoplazmi); 3 – MII oocita ocjenjena ocjenom 3 (velike vakuole u citoplazmi, fragmenti u PVS, inkluzije u citoplazmi); PVS – perivitelini prostor.

3.2.3.2. Morfološko ocjenjivanje zigote (1. dan)

Oplodjene jajne stanice kultivirane su kroz 3 do 5 dana, u posudicama držanim u inkubatoru na 37 °C i 6 % CO₂. Svaki dan, u određeno vrijeme, provjeravala se brzina diobe i njihova morfologija. Sve provjere diobe zametaka izvedene su u bezprašnoj komori, pod stereomikroskopom, na radnoj plohi zagrijanoj na 37 °C. Nakon 16 do 18 sati od oplodnje (1. dan) pod invertnim mikroskopom analizirana je morfološka kvaliteta oplodjenih jajnih stanica (zigota) te su im dodijeljene odgovarajuće ocjene.

Uspješnost same oplodnje procijenjena je na temelju pronukleusa te je oplodnja smatrana uspješnom ukoliko su vidljiva 2 PN. Ukoliko je promijenjen broj PN, oocita je označena s 1PN ili 3PN, a ukoliko PN nisu uopće vidljivi, oocita je označena s NF (NF; eng. *not fertilized*).

Uspješno oplodjene oocite podvrgnute su detaljnijoj morfolškoj procijeni na temelju procjene sljedećih karakteristika (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology 2011):

1. Veličina pronukleusa,
2. Simetrija pronukleusa,
3. Smještaj pronukleusa te

4. Smještaj NPB-ova.

Procjena navedenih karakteristika izvršena je isključivo u svrhu ovog istraživanja te nije dio rutinskog laboratorijskog ocjenjivanja. Na temelju ove četiri karakteristike, zigota je ocijenjena ocjenama od 1 do 3 (tablica 4). Primjeri morfološki različito ocjenjenih zigota prikazani su na slici 13.

Tablica 4. Ocjenjivanje zigota.

Ocjena zigote	Karakteristike
1	Zadovoljavajuća morfologija sve 4 karakteristike*
2	1 od 4 karakteristike* nezadovoljavajuće morfologije
3	2 ili više karakteristika* nezadovoljavajuće morfologije

* - prethodno navedene u tekstu



Slika 13. Ogledni primjer morfološki različito ocjenjenih zigota. 1 – zigota ocijenjena ocjenom 1 (zadovoljavajuća morfologija svih promatranih karakteristika); 2 – zigota ocijenjena ocjenom 2 (nepravilan raspored i broj NPB-ova u PN); 3 – zigota ocijenjena ocjenom 3 (nepravilan raspored NPB-ova u PN, veliki PVS); NPB – nukleolarna prekursorska tjelešca; PN – pronukleusi.

3.2.3.3. Morfološko ocjenjivanje embrija (2. i 3. dan)

Nakon 40 do 42 sata od oplodnje (2. dan) provjerena je brzina diobe zametaka, broj i jednakost blastomera te prisutnost fragmentacije. Ocjena embrija sastojala se od procjene broja nastalih blastomera (npr. 4, ukoliko se zametak sastoji od četiri blastomere), njihove morfologije (ocjena A za blastomere jednakih veličina ili ocjena B za blastomere nejednakih veličina), te procjene postotka fragmentacije (ocjena 1 ako je fragmentacije manje od 20%, ocjena 2 ako iznosi 20 do 50% te ocjena 3 ako je fragmentacije više od 50%). U takvom sustavu ocjenjivanja, idealni embrij bio bi ocijenjen s 4A1, što znači da se sastoji od četiri blastomere, jednake veličine, s postotkom fragmentacije manjim od 20%.

Nakon 64 do 66 sati od oplodnje (3. dan) ponovno je provjerena brzina diobe zametaka, broj i jednakost blastomera te prisutnost fragmentacije. Korišten je isti sustav ocjenjivanja kao i za embrije 2. dana, sastavljen od broja, koji označava broj nastalih blastomera, slova A ili B, koje označava jednakost blastomera, i broja 1, 2 ili 3, koji odgovara postotku fragmentacije. Idealni embrij 3. dana, prema tome, imao bi ocjenu 8A1 što znači da se sastoji od osam blastomera, jednake veličine, s postotkom fragmentacije manjim od 20%. Zbog daljnje statističke analize svi na ovaj način ocijenjeni embriji klasificirani su u tri skupine, ocijenjene ocjenama od 1 do 3, koje su uključivale sve tri prethodno navedene karakteristike (tablica 5). Primjeri morfološki različito ocijenjenih embrija prikazani su na slici 14.



Slika 14. Ogledni primjer morfološki različito ocijenjenih embrija 3. dana. 1 – embrij ocijenjen ocjenom 1 (≥ 7 blastomera jednake veličine, fragmentacija $< 20\%$); 2 – embrij ocijenjen ocjenom 2 (4 - 6 blastomera nejednake veličine, fragmentacija $< 20\%$); 3 – embrij ocijenjen ocjenom 3 (≤ 4 blastomere nejednake veličine, fragmentacija $> 50\%$).

Tablica 5. Ocjenjivanje embrija (3. dan).

Broj blastomera	Karakteristika embrija	Ocjena embrija		
		1	2	3
≤ 4	Jednakost blastomera*:			A ili B
	Fragmentacija**:			1, 2 ili 3
	Primjer ocjene:			4A3, 4B3, 3A1, 3B1, 3A2, 3B2...
4 – 6	Jednakost blastomera*:		A ili B	A ili B
	Fragmentacija**:		1	2
	Primjer ocjene:		4A1, 4B1, 5A1, 5B1, 6A1, 6B1	4A2, 4B2, 5A2, 5B2, 6A2, 6B2
≥ 7	Jednakost blastomera*:	A ili B	A ili B	A ili B
	Fragmentacija**:	1	2	3
	Primjer ocjene:	7A1, 7B1, 8A1, 8B1	7A2, 7B2, 8A2, 8B2	7A3, 7B3, 8A3, 8B3

*A – blastomere jednakih veličina; B – blastomere nejednakih veličina; ** 1 – fragmentacija < 20%; 2 – fragmentacija od 20 do 50%; 3 – fragmentacija > 50%

3.2.4. Izolacija i kvantifikacija RNA iz stanica kumulusa

Izolacija RNA iz stanica kumulusa započeta je neposredno nakon prikupljanja stanica kumulusa, dodatkom inhibitora RNaze, beta-merkaptetanola (βME). Na samom početku izolacije RNA se dodaje βME, kako bi eliminirao postojeće RNaze koje se oslobađaju prilikom lize stanica. Djelovanje βME vezano je na razaranje disulfidnih veza unutar RNaza, čime se RNaze ireverzibilno denaturiraju, te je izbjegnuta razgradnja RNA molekule tijekom njene izolacije. Paralelno s dodatkom inhibitora RNaze, na talog stanica dodan je i pufer za lizu stanica (RLT Buffer, Rneasy Micro kit, Qiagen, Njemačka), nakon čega su stanice homogenizirane vorteksiranjem (Genius Vortex 3, IKA, Njemačka) te zamrznute na -20 °C, sve do nastavka izolacije. Daljnja izolacija RNA provedena je prema protokolu proizvođača čiji su reagensi korišteni za izolaciju RNA molekula (Rneasy Micro Kit, Qiagen, Njemačka), a koji je

prilagođen za izolaciju ukupne RNA iz male količine uzorka kakvom smo raspolagali. Izolacija započinje lizom i homogeniziranjem stanica, nakon čega se dodaje etanol kako bi se osigurali uvjeti za vezivanje RNA - molekule. Uzorci se tada prenose na kolone, za čije će se membrane vezati RNA. Dodatkom deoksiribonukleaza (DNaza), slobodnih od RNaza, osigurali smo razgradnju genomske DNA sadržane u uzorcima. U slijedećim koracima dolazi do ispiranja vezane RNA s priloženim puferima pri čemu se uklanjaju zaostale nečistoće. Čista, koncentrirana RNA ispire se s membrane dodatkom čiste vode bez RNaza. Cijeli se protokol izvodi centrifugiranjem (Centrifuge 5427 R, Eppendorf, Njemačka) specifičnih kolona koje dolaze s prethodno navedenim reagensima za izolaciju. Izolacija navedenim protokolom osigurava adekvatnu čistoću dobivene RNA, nužnu za kasnije osjetljive kvantitativne analize genske ekspresije.

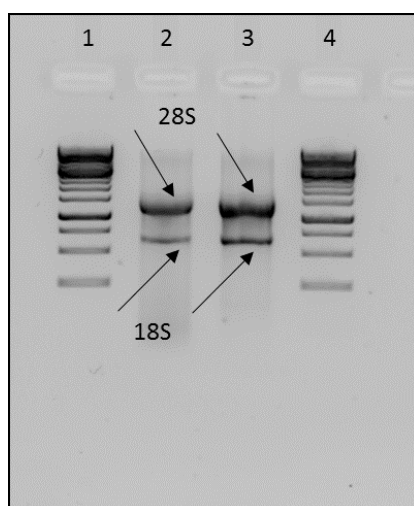
Koncentracija izolirane RNA provjerena je fluorometrijski (Qubit Fluorometer, Thermo Fisher Scientific, SAD), korištenjem odgovarajućeg kita (Qubit RNA HS Assay Kit, Thermo Fisher Scientific, SAD), koji sadrži sve potrebne reagense, kao i dva RNA standarda. Priloženi reagens razrijeđen je priloženim puferom, prema uputama proizvođača, te je dodano 2 do 5 µl uzorka RNA. Koncentracije su izračunate prema priloženoj formuli: koncentracija = očitana vrijednost x (200 / volumen uzorka).

Koncentracija, kao i čistoća, izolirane RNA provjerena je i spektrofotometrijski (BioDrop DUO, Biodrop, Ujedinjeno Kraljevstvo). Spektrofotometrijska analiza temelji se na činjenici da nukleinske kiseline (uključujući i RNA) apsorbiraju ultraljubičasto svjetlo valne duljine od 260 nm, što omogućuje određivanje koncentracije, bez izrade standardne krivulje. Osim koncentracije, spektrofotometrijsko određivanje, omogućuje i procjenu čistoće izolirane RNA molekule, određivanjem omjera apsorbancije pri 260 nm i 280 nm, tzv. A260/280 omjer. S obzirom da proteini apsorbiraju ultraljubičasto svjetlo valne duljine od 280 nm, ovaj nam omjer daje informaciju o kontaminaciji uzorka proteinima zaostalim tijekom procesa izolacije. Idealni uzorak RNA trebao bi imati A260/280 omjer oko 2.

Osim navedenim metodama, kvaliteta izolirane RNA provjerena je i provođenjem elektroforeze na agaroznom gelu. Ova metoda ispitivanja kvalitete nije provedena na svim uzorcima, zbog ograničene količine uzoraka kojom smo raspolagali. Agarozni gel izrađen je miješanjem 0,6 g agaroze u 60 ml 1xTAE pufera (40 mM Tris baza, 20 mM octena kiselina i 1 mM EDTA) uz dodatak 0,2 ml fluorescentne boje za vizualizaciju RNA (GelRed, Olerup, Austrija). Na pripremljen gel nanoseno je 1 do 3 µg RNA uzorka.

Elektroforeza je provedena na sustavu za elektroforezu (MultiSUB Mini Electrophoresis System, Cleaver Scientific, Ujedinjeno Kraljevstvo) vezanom za izvor energije (Nano PAC-300 Power Supply, Cleaver Scientific, Ujedinjeno Kraljevstvo), pri 150V kroz 45 minuta. Vizualizacija je izvršena na transiluminatoru (Standard UV Transilluminator, Cleaver Scientific, Ujedinjeno Kraljevstvo). Idealan uzorak sadržavao je dvije oštre linije: 28S i 18S rRNA, pri čemu je 28S rRNA dvostruko jačeg intenziteta od 18S (slika 15). Upravo taj 2:1 omjer je dobar pokazatelj stabilnosti tj. neoštećenosti izolirane RNA molekule. Gelovi su dokumentirani fotografiranjem (Image Quant LAS 500, GE Healthcare Life Sciences, Ujedinjeno Kraljevstvo).

Uzorci RNA neadekvatne koncentracije i čistoće isključeni su iz daljnjeg istraživanja, te je izolacija ponovljena, ukoliko je količina uzorka to dozvoljavala.



Slika 15. Ogledni primjer elektroforeze na agaroznom gelu provedene na dva različita uzorka s jasno vidljive dvije linije: 28S i 18S rRNA u omjeru 2:1. 1, 4 – marker; 2, 3 – dva različita uzorka (429/15.1 i 568/15.1).

3.2.5. Reverzna transkripcija RNA u cDNA i kvantifikacija dobivene cDNA

Neposredno nakon izolacije RNA iz stanica kumulusa te provjere njihove koncentracije i kvalitete, zbog nestabilnosti molekule RNA, provedena je reverzna

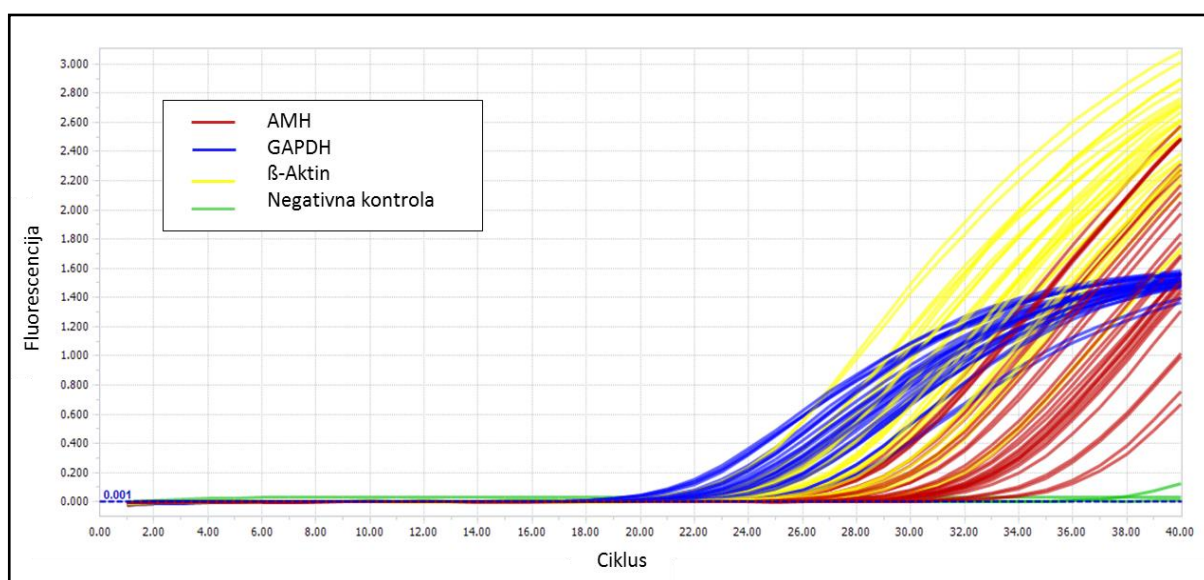
transkripcija u komplementarnu DNA (cDNA; eng. *complementary DNA*). Reverzna transkripcija izolirane RNA provedena je upotrebom komercijalnih reagensa (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, SAD) prema protokolu navedenom od proizvođača, na uređaju za lančanu reakciju polimerazom (PCR; eng. *polymerase chain reaction*) (Mastercycler Nexus Thermal Cycler, Eppendorf, Njemačka). Reverzna transkripcija odvija se u nekoliko koraka: denaturacija sekundarnih struktura RNA molekula zagrijavanjem na 65°C, uz inhibitor RNaze; vezivanje početnica pri temperaturi od 25°C; inkubacija na temperaturi potrebnoj za djelovanje enzima, tijekom koje dolazi do sinteze prvog lanca cDNA; te inaktivacija reverzne transkriptaze, zagrijavanjem na 95°C (opisano u Ambriović Ristov 2007). Nakon dobivanja cDNA molekule, ona se umnaža, provođenjem lančane reakcije polimerazom. Korišteni komercijalni reagensi uključivali su sve potrebne reagense za provođenje reakcije: pufer, nasumične početnice, mješavinu deoksiribonukleotida, reverznu transkriptazu te inhibitor RNaze. Po 10 µl navedene mješavine i 10 µl uzorka RNA odmjeren je u reakcijsku mikroeprijetu, koja je podvrgnuta programu PCR - uređaja, prema uputama proizvođača.

Koncentracija i čistoća dobivene cDNA provjerene su spektrofotometrijski (BioDrop DUO, Biodrop, Ujedinjeno Kraljevstvo) koristeći prethodno navedene principe. Idealno, A260/280 omjer za DNA molekulu trebao bi iznositi oko 1,8. Prosječna koncentracija dobivenih cDNA iznosila je 1724,16 µg/ml. Dobivena cDNA zamrznuta je na -20 °C do daljnje analize.

3.2.6. Relativna kvantifikacija genske ekspresije AMH, AMHR2, FSHR i AR pomoću RT-PCR-a

Analiza ekspresije istraživanih gena provedena je relativnom kvantifikacijom na uređaju za lančanu reakciju polimerazom u stvarnom vremenu (RT-PCR; eng. *real time polymerase chain reaction*) (LightCycler 96 System, Roche, Švicarska). Radi se o pouzdanoj i preciznoj metodi koja omogućuje kvantifikaciju vrlo male količine mRNA (opisano u Ambriović Ristov 2007). Osnovna reakcijska smjesa slična je kao u konvencionalnom PCR-u te se sastoji od ciljane DNA molekule, dvije početnice, dNTP (dNTP; eng. *deoxy nucleoside triphosphate*), pufera i termostabilne DNA polimeraze. Osim navedenog, za RT-PCR potrebna je još i fluorescentna proba koja hibridizira sa

specifičnom sekvencom unutar ciljanog fragmenta i tijekom amplifikacije daje signal koji se detektira u stvarnom vremenu, tijekom same reakcije. Analiza ekspresije gena putem RT-PCR-a podrazumijeva detekciju fluorescencije emitiranu od strane fluorescentne probe pri čemu je količina detektirane fluorescencije proporcionalna količini nastalog PCR - produkta. Umnažanje PCR - produkata odvija se u tri faze: u eksponencijalnoj fazi umnažanje je najbrže, u svakom ciklusu količina DNA se udvostruči, a odvijanje reakcije je visoko specifično i precizno; u linearnoj fazi dolazi do usporavanja amplifikacije, troše se komponente reakcijske smjese, a moguća je i degradacija produkata; zaustavljanje reakcije karakterizira tzv. plato, kada više nema amplifikacije i nastanka produkata, već se pojačava njihova degradacija (slika 16).



Slika 16. Ogladni primjer prikaza amplifikacijskih krivulja 15 uzoraka stanica kumulusa, u duplikatu, za AMH - gen, obje endogene kontrole (GAPDH i β-aktin) i tri negativne kontrole.

Detekcija PCR - amplifikacije izvodi se u eksponencijalnoj fazi pomoću određivanja granične vrijednosti (tzv. *threshold* vrijednost), koja predstavlja nivo fluorescencije koja se mora detektirati u svakom uzorku. Uzorci se međusobno razlikuju po broju ciklusa amplifikacije (Ct vrijednost) koji su im potrebni za dostizanje

te zadane vrijednosti fluorescencije. Ct vrijednost pruža informaciju o tome koliko je ciklusa potrebno da reakcija dođe u ekspanencijsku fazu. Što je Ct vrijednost manja početna količina kopija ciljanog gena je u uzorku veća, odnosno, što je veća početna količina gena u uzorku to je potrebno manje ciklusa da se dostigne zadana fluorescencija. Ekspresija određenog gena veća je kada reakcija ranije dosegne ekspanencijsku fazu. Ct vrijednost je potrebna za kvantifikaciju ekspresije testiranih gena.

Za provođenje relativne kvantifikacije ekspresije analiziranih gena potrebna je i jedna ili više endogenih kontrola, kojima se normaliziraju svi uzorci. Endogena kontrola je gen koji je ujednačeno eksprimiran u svim stanicama (eng. *housekeeping* gen). Relativna kvantifikacija ekspresije gena podrazumijeva određivanje Ct vrijednosti ciljanih gena i endogenih kontrola u različitim grupama uzoraka. Iz dobivenih vrijednosti računaju se ΔCt i $\Delta\Delta Ct$ vrijednosti prema slijedećim formulama:

$$\Delta Ct = Ct(\text{ciljanog gena}) - Ct(\text{endogene kontrole})$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{grupa 1}) - \Delta Ct(\text{grupa 2})$$

U istraživanju su korištene dvije endogene kontrole, GAPDH i β -aktin, te je normalizacija provedena uzimajući obje u obzir. Enzim GAPDH (gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza) uključen je u katalizaciju jednog od koraka glikolize, tijekom kojeg dolazi do razgradnje glukoze, uz oslobađanje energije. U većini stanica i tkiva, GAPDH je stalno eksprimiran te se smatra *housekeeping* genom (Barber i sur. 2005). Beta-aktin je visokokonzervirani protein, jedna od šest izoformi aktina, a uključen je u izgradnju staničnog citoskeleta, također jedan od najčešće korištenih *housekeeping* gena (Ruan i Lai 2007).

Kao fluorescentna proba, u istraživanju je korištena proba TaqMan - tehnologije. Takva se proba sastoji od fluorescentne boje (FAM, VIC ili sl.), vezane za njen 5' kraj, i od „utišavača“ (eng. *quencher*), vezanog za njen 3' kraj. „Utišavač“ utišava emitiranje fluorescentnog signala dok god se on nalazi u blizini fluorescentne boje. Proba TaqMan se vezuje za DNA molekulu koja se umnožava tijekom PCR - reakcije. Kako dolazi do sinteze lanca DNA, od početnica, nadalje, egzonukleazna aktivnost Taq polimeraze razgrađuje vezanu probu što dovodi do odvajanja fluorescentne boje. Ona se udaljava od „utišavača“, njegovo djelovanje prestaje te se počinje emitirati fluorescentni signal. Signal koji detektira uređaj za provođenje PCR - reakcije, direktno

je proporcionalan količini oslobođene fluorescentne boje, odnosno količini prisutne DNA.

Za određivanje genske ekspresije svih testiranih gena, uključujući i endogene kontrole, korišteni su eseji TaqMan tehnologije: za AMH (Assay ID: Hs01006984_g1), AMHR2 (Assay ID: hs00179718_m1), FSHR (Assay ID: hs00174865_m1) i AR (Assay ID: hs00171172_m1), GAPDH (Assay ID: Hs03929097_g1) i β -aktin (Assay ID: Hs99999903_m1) (TaqMan Gene Expression Assays, Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, SAD), uz korištenje adekvatne temeljne reakcijske smjese (eng. *mastermix*) (TaqMan Gene Expression Master Mix, Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, SAD). Postupci analize provedeni su u skladu s uputama proizvođača. Za izračun ΔCt i $\Delta\Delta Ct$ vrijednosti korišten je software samog uređaja za RT-PCR (LightCycler 96 Software, Version 1.1.0.1320, Roche, Švicarska).

3.2.7. Određivanje koncentracije AMH u folikularnoj tekućini

Koncentracija AMH u folikularnoj tekućini najvećeg folikula uključenih ispitanica, određena je pomoću enzimatski pojačanog dvostrukog imunološkog testa, ELISA - testa (eng. *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Tehnika ELISA - testa temelji se na specifičnoj interakciji antigena i protutijela (opisano u Ambriović Ristov 2007). Odvija se na čvrstoj fazi, najčešće mikrotitarskoj pločici od specifičnog plastičnog materijala, koji na svojoj površini adsorbira slojeve molekula (antigena). Na toj se površini odvijaju sve faze testa. Rezultat testa vizualizira se enzimskom reakcijom u posljednjoj fazi testa. Prisutnost antigena ili protutijela detektira se pomoću sekundarnih protutijela obilježenih enzimom. Enzimu se dodaje supstrat koji, nakon odvijene enzimске reakcije, dovodi do pojave obojenog produkta čiji se intenzitet obojenja mjeri.

U istraživanju su korištene mikrotitarske pločice čije su jažice obložene s anti-AMH - antitijelom, a dio su korištenog kita za provođenje ELISA - testa (AMH Gen II ELISA, Beckman-Coulter, SAD). Postupak je izveden u skladu s uputama proizvođača. U jažice se najprije dodaje šest kalibratora poznatih koncentracija AMH (0 ng/ml, 0.16 ng/ml, 0.4 ng/ml, 1.2 ng/ml, 4.0 ng/ml, 10.0 ng/ml i 22.5 ng/ml), dvije kontrole, niske i visoke koncentracije AMH, te uzorci, sve u duplikatu. Nakon inkubacije, ispiranja i sušenja, u jažice se dodaje biotinizirano anti-AMH - protutijelo, nakon čega slijedi nova

inkubacija, ispiranje i sušenje. Zatim se u svaku jažicu dodaje enzim streptavidin peroksidaza iz hrena. Ponovno slijedi inkubacija, detaljno ispiranje i sušenje, nakon čega se u jažice dodaje supstrat tetrametilbenzidin. Nakon kraće inkubacije u mraku, reakcija se zaustavlja dodatkom 0.2 M sulfatne kiseline. Stupanj enzimske pretvorbe supstrata određuje se mjerenjem apsorbancije pri 450nm.

Apsorbancija je očitana, unutar 20 minuta na čitaču pločica (Infinite 200 PRO, Tecan, Švicarska) prema preporukama proizvođača. Izmjerena apsorbancija proporcionalna je koncentraciji AMH u uzorku. Točna koncentracija AMH u svakom uzorku određuje se iz kalibracijske krivulje izrađene pomoću niza od šest AMH kalibratora poznatih koncentracija.

3.3. Statistička obrada podataka

Statistička analiza relativne ekspresije gena provedena je na računalnom programu REST 2009 (Relative Expression Software Tool V2.0.13, Qiagen, Njemačka). Izračun ΔCt - i $\Delta\Delta Ct$ - vrijednosti izveden je upotrebom programa samog uređaja za RT-PCR (LightCycler 96 Software, Version 1.1.0.1320, Roche, Švicarska). Relativna ekspresija izračunata je za svaki od testiranih gena (AMH, AMHR2, FSHR i AR) s obzirom na morfološku ocjenu oocite, zigote i embrija, s obzirom na izvedeni prijenos zametka, te s obzirom na ustanovljenje trudnoće.

Za ispitivanje statističke značajnosti razlika među različitim skupinama podataka korišten je t-test za nezavisne uzorke, izračunat pomoću računalnog programa Statistica (Data Analysis Software System, Version 12., Statistica, StatSoft, Dell Inc., SAD). Izračun statističke povezanosti koncentracije AMH u folikularnoj tekućini s ekspresijom istraženih gena u pripadajućim stanicama kumulusa, odnosno izračun korelacija između svakog od mjerenih parametara, proveden je istim računalnim programom te programom MedCalc (MedCalc Software, Version 15.2.2., Belgija), upotrebom adekvatnih neparametrijskih testova (Spearmanov i Kendall Tau test korelacije rangova).

Rezultati su prikazani tablicama i slikama. Statistički značajnim smatran je koeficijent statističke značajnosti, p, koji je manji od 0.05, za sve analize.

4. REZULTATI

4.1. Morfološko ocjenjivanje jajnih stanica, zigota i embrija

4.1.1. Morfološko ocjenjivanje jajnih stanica

U morfološko ocjenjivanje uključeno je ukupno 129 prikupljenih jajnih stanica. Na temelju prethodno navedenih morfoloških karakteristika (tablica 2) sve su jajne stanice svrstane u četiri kategorije: MII, MI, PI i atretične. Većina stanica, njih 111 (86.05%) kategorizirano je kao MII, dok je njih 6 (4.65%) označeno kao MI, njih 7 (5.43%) kao PI, a 5 (3.88%) kao atretične. Stanice ocjenjene kao MII (n = 86) podvrgnute su detaljnijem morfološkom ispitivanju pri čemu su im procijenjeni izgled perivitelinog prostora, prisutnost inkluzija, izgled prvog polarnog tijela, nakupljanje organela u citoplazmi, prisutnost sER diskova te prisutnost vakuola, na temelju čega su im dodijeljene su ocjene od 1 do 3 (tablica 3). Dobiveni rezultati su prikazani u tablici 6.

4.1.2. Morfološko ocjenjivanje zigota

Neposredno nakon provedene ICSI - metode procijenjena je uspješnost postupka oplodnje. Postupak je izveden na 117 jajnih stanica prethodno ocijenjenih kao MII i MI. Oplodnja je uspješno izvedena u 64.96% slučajeva (n = 76), nepravilan broj pronukleusa utvrđen je u 5.13% stanica (n = 6), dok 29.91% nije uspješno oplođeno (n = 35). Uspješno oplođene jajne stanice – zigote (n = 71), podvrgnute su detaljnoj morfolškoj karakterizaciji na temelju prethodno navedenih karakteristika te su im dodijeljene ocjene od 1 do 3 (tablica 4). Dobiveni rezultati su prikazani u tablici 6.

4.1.3. Morfološko ocjenjivanje embrija

Drugi dan od oplodnje provedena je morfološka karakterizacija embrija pri čemu je provjerena brzina njihove diobe, broj i jednakost blastomera te prisutnost fragmentacije, na temelju čega su embrijima dane odgovarajuće ocjene. Treći dan od oplodnje postupak je ponovljen te su svim embrijima dodijeljene ocjene od 1 do 3 prema navedenim karakteristikama (tablica 5). Ukupno su ocjenjena 102 embrija, od

kojih je 55 bilo prethodno uključeno u detaljnu morfološku analizu oocite i zigote. Ukupan broj ocjenjenih embrija (102) je veći od broja detaljno ocjenjenih oocita i zigota jer se u rutinskom radu laboratorija svim uključenim embrijima dodjeljuje detaljna ocjena. Dobiveni rezultati su prikazani u tablici 6. Ukoliko ET nije obavljen treći dan, morfološko ocjenjivanje embrija je nastavljeno i peti dan od oplodnje.

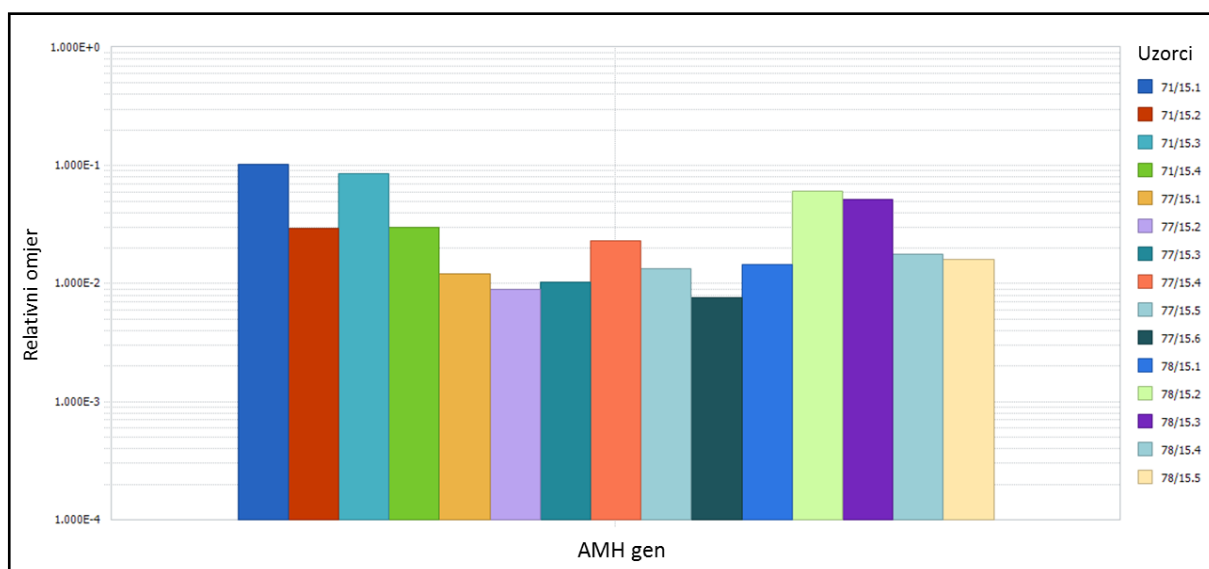
Tablica 6. Raspodjela oocita, zigota i embrija na temelju morfoloških ocjena.

		OCJENA		
		1	2	3
OOCITA	(n = 86)	46 (53.49%)	14 (16.28%)	26 (30.23%)
ZIGOTA	(n = 71)	31 (43.66%)	15 (21.13%)	25 (35.21%)
EMBRIJ	(n = 55)	21 (38.18%)	14 (25.45%)	20 (36.36%)

Ocjene 1, 2 i 3 – prema tablicama 3, 4 i 5

4.2. Analiza genske ekspresije AMH, AMHR2, FSHR i AR

Analiza ekspresije istraživanih gena svih 129 uzoraka stanica kumulusa provedena je relativnom kvantifikacijom na uređaju za lančanu reakciju polimerazom u stvarnom vremenu uz normalizaciju dvjema endogenim kontrolama (GAPDH i β -aktin), upotrebom TaqMan fluorescentne probe. Izračun relativne ekspresije istraživanih gena izveden je pomoću računalnog programa samog uređaja za RT-PCR (slika 17). Dobivene srednje Ct i Δ Ct vrijednosti prikazane su u tablici 7.



Slika 17. Ogledni primjer prikaza relativne ekspresije AMH - gena u 15 uzoraka stanica kumulusa (normalizirane pomoću endogenih kontrola GAPDH i β -aktin).

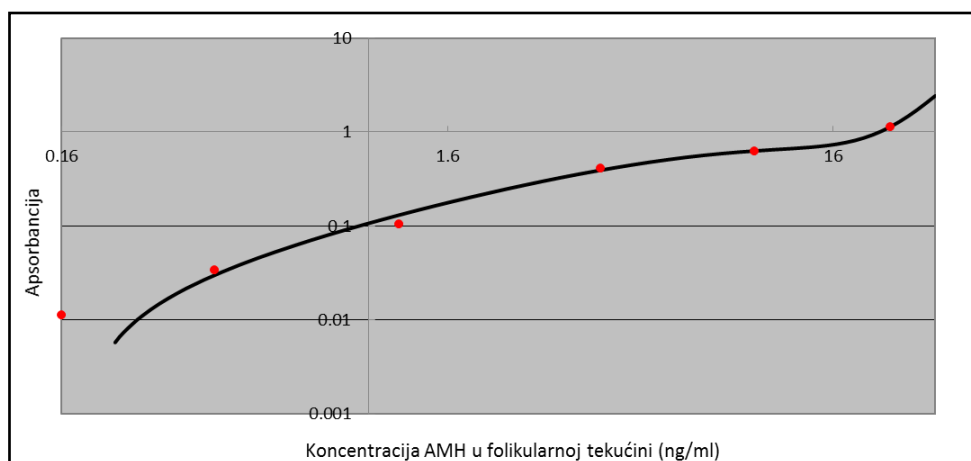
Tablica 7. Srednje Ct i Δ Ct vrijednosti gena AMH, AMHR2, FSHR i AR dobivene normalizacijom endogenim kontrolama (GAPDH i β -aktin).

	Ct	Δ Ct
	Srednja vrijednost \pm SD	Srednja vrijednost \pm SD
AMH	28.933 \pm 2.309	5.458 \pm 1.306
AMHR2	31.520 \pm 1.736	8.045 \pm 1.081
FSHR	34.536 \pm 1.780	11.061 \pm 1.001
AR	28.835 \pm 1.640	5.360 \pm 0.992

Ct – broj ciklusa amplifikacije potreban za dostizanje zadane vrijednosti fluorescencije; Δ Ct – razlika Ct vrijednosti ciljanog gena i geometrijske sredine Ct vrijednosti endogenih kontrola; SD – standardna devijacija

4.3. Određivanje koncentracije AMH u folikularnoj tekućini

Koncentracija AMH određena je u 35 uzoraka folikularne tekućine, za koje smo sa sigurnošću mogli utvrditi da su okruživali točno određene jajne stanice pomoću enzimatski pojačanog dvostrukog imunološkog testa, ELISA - testa. Koncentracija AMH u svakom uzorku određena je iz kalibracijske krivulje izrađene pomoću niza od šest AMH kalibratora poznatih koncentracija (slika 18). Srednja vrijednost očitanih koncentracija iznosila je 13.120 ± 10.507 ng/ml, dok je medijan iznosio 8.499 (3.430 – 24.799) ng/ml (tablica 8).



Slika 18. Kalibracijska krivulja izvedena od 6 kalibratora poznatih koncentracija, uključenih u ELISA - test, na temelju koje su određene vrijednosti AMH - koncentracije uzoraka.

Tablica 8. Koncentracije AMH u folikularnoj tekućini.

	Srednja vrijednost ± SD	Medijan (q25 – q75)	Raspon
Koncentracija AMH	13.120 ± 10.507	8.499 (3.430 – 24.799)	0.956 -29.437

SD – standardna devijacija; q25 – 25. percentila; q75 – 75. percentila

4.4. Utjecaj dobi na morfologiju jajne stanice, zigote i embrija, na razinu genske ekspresije AMH, AMHR2, FSHR i AR u stanicama kumulusa te na koncentraciju AMH u folikularnoj tekućini

U svrhu procjene utjecaja dobi na morfologiju jajnih stanica, zigota i embrija, morfologija svega navedenog podijeljena je na optimalnu i suboptimalnu. Optimalna morfologija uključivala je uzorke bez ikakvih nedostataka, dok su suboptimalnim smatrani svi uzorci s bilo kakvim nedostatkom. U statističku procjenu utjecaja dobi uključeno je 129 oocita, od kojih je uspješno oplodeno njih 117 (zigote), od kojih se njih 102 razvilo do stadija embrija. Embrij je procjenjivan treći dan od oplodnje. Stanice koje se iz različitih razloga nisu oplodile nisu uključene u daljnje procjenjivanje, kao ni zigote koje se nisu razvile do stadija embrija (3. dan). Nije uočena statistički značajna razlika u morfologiji ni jednog od istraživanih uzoraka s obzirom na dob uključenih ispitanica (χ^2 – test; $p \geq 0.05$; tablica 9).

Tablica 9. Morfologija oocita, zigota i embrija pacijentica mlađih od 35 godina i pacijentica starih 35 godina i više.

	Dob < 35	dob \geq 35	χ^2 , p
OOCITA (n = 129)			
Optimalna morfologija	n = 39	n = 68	$\chi^2 = 0.63$
Suboptimalna morfologija	n = 10	n = 12	p = 0.428
ZIGOTA (n = 117)			
Optimalna morfologija	n = 29	n = 44	$\chi^2 = 1.06$
Suboptimalna morfologija	n = 13	n = 31	p = 0.304
EMBRIJ (n = 102)			
Optimalna morfologija	n = 9	n = 20	$\chi^2 = 0.67$
Suboptimalna morfologija	n = 29	n = 44	p = 0.413

χ^2 – izlazni parametar χ^2 -testa; p – koeficijent statističke značajnosti

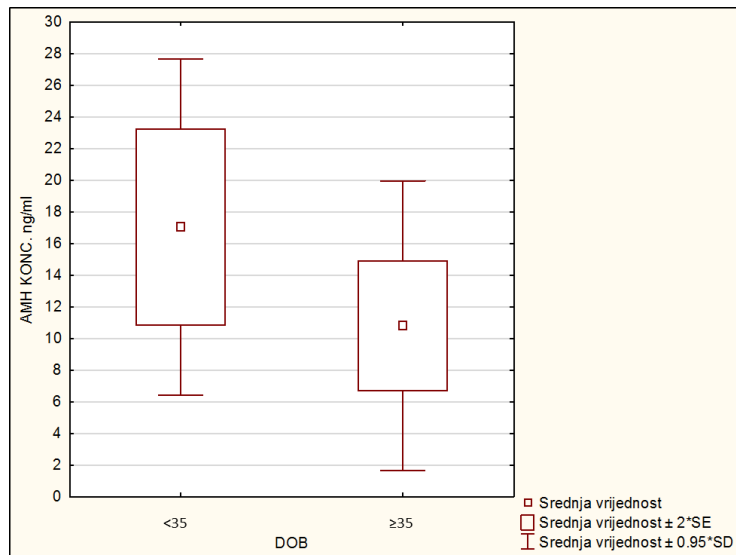
Što se tiče utjecaja dobi na razinu ekspresije istraživanih gena (AMH, AMHR2, FSHR, AR), nije ustanovljena statistički značajna razlika u ΔCt vrijednostima između pacijentica mlađih od 35 godina i starih 35 godina ili više (Studentov t-test; $p \geq 0.05$; tablica 10).

Tablica 10. ΔCt vrijednosti gena AMH, AMHR2, FSHR i AR pacijentica mlađih od 35 godina i pacijentica starih 35 godina i više.

	Dob < 35	dob \geq 35	Izlazni	
	ΔCt	ΔCt	parametar	p
	srednja vrijednost \pm SD	srednja vrijednost \pm SD	testa	
AMH	5.288 \pm 1.116	5.562 \pm 1.406	t = -1.156	0.250
AMHR2	8.046 \pm 0.842	8.044 \pm 1.209	t = 0.010	0.992
FSHR	11.010 \pm 1.043	11.092 \pm 0.980	t = -0.454	0.651
AR	5.321 \pm 0.911	5.384 \pm 1.044	t = -0.349	0.728

ΔCt – razlika Ct vrijednosti ciljanog gena i geometrijske sredine Ct vrijednosti endogenih kontrola; SD – standardna devijacija; t – izlazni parametar Studentovog t-testa; p – koeficijent statističke značajnosti

Koncentracija AMH određena je u folikularnoj tekućini 35 pacijentica, od čega je njih 13 bilo mlađe od 35 godina, dok ih je 22 imalo 35 ili više godina. Pacijentice iz grupe starije životne dobi (≥ 35) imale su nižu srednju vrijednost određene koncentracije AMH (10.81 \pm 9.63) u odnosu na pacijentice iz mlađe grupe (< 35) (17.05 \pm 11.16), no nađena razlika nije bila statistički značajna (Mann Whitney U-test, z = 1.314; p = 0.189; slika 19).



Slika 19. Razlika u koncentracijama ff AMH između skupina pacijentica životne dobi < 35 i ≥ 35. ff AMH – AMH u folikularnoj tekućini.

Od ukupno 129 sakupljenih uzoraka COC-a, 11 ih je rezultiralo biokemijskom trudnoćom (8.5%). Osam je uzoraka oplođeno i u stadiju embrija zamrznuto; od njih osam, tri je podvrgnuto prijenosu zametka te je jedan također rezultirao trudnoćom. Nije uočena statistički značajna razlika u broju postignutih trudnoća između pacijentica mlađih od 35 godina i pacijentica starih 35 godina i više (χ^2 – test, $\chi^2 = 0.28$; $p = 0.594$).

4.5. Utjecaj hormonske stimulacije na morfologiju jajne stanice, zigote i embrija, na razinu genske ekspresije AMH, AMHR2, FSHR i AR u stanicama kumulusa te na koncentraciju AMH u folikularnoj tekućini

Da bi utvrdili utjecaj primjene različitih hormonskih stimulacija, provedena je statistička analiza povezanosti korištenih stimulacija sa svim istraživanim parametrima. Uzroci su podijeljeni u tri različite skupine s obzirom na stimulaciju koju su pacijentice primale: brojem 1 označena je skupina koja je bila u modificiranom prirodnom ciklusu, brojem 2 skupina na terapiji antagonističkim protokolom stimulacije jajnika, a brojem 3 skupina na terapiji agonističkim protokolom.

Uzorci su (oocite, zigote i embriji), kao i u prethodnom slučaju, morfološki podijeljeni na optimalne i suboptimalne te je provedena statistička analiza razlika među grupama pod različitim hormonskim stimulacijama. Stanice koje se iz različitih razloga nisu oplodile nisu uključene u daljnje procjenjivanje, kao ni zigote koje se nisu razvile do stadija embrija (3. dan). Nije utvrđena statistički značajna povezanost korištene hormonske stimulacije i morfologije ispitivanih oocita, zigota i embrija (χ^2 – test; $p \geq 0.05$; tablica 11).

Tablica 11. Morfologija oocita, zigota i embrija dobivenih od pacijentica liječenih u modificiranom prirodnom ciklusu i uz različite protokole hormonske stimulacije.

	Hormonska stimulacija			
	1	2	3	χ^2 , p
OOCITA (n = 129)				
Optimalna morfologija	n = 30	n = 74	n = 3	$\chi^2 = 2.57$
Suboptimalna morfologija	n = 4	n = 16	n = 2	p = 0.277
ZIGOTA (n = 117)				
Optimalna morfologija	n = 19	n = 53	n = 1	$\chi^2 = 1.26$
Suboptimalna morfologija	n = 12	n = 30	n = 2	p = 0.531
EMBRIJ (n = 102)				
Optimalna morfologija	n = 9	n = 19	n = 1	$\chi^2 = 0.98$
Suboptimalna morfologija	n = 18	n = 54	n = 1	p = 0.612

1 – modificirani prirodni ciklus; 2 – antagonistički protokol stimulacije jajnika; 3 – agonistički protokol stimulacije jajnika; χ^2 – izlazni parametar χ^2 -testa; p – koeficijent statističke značajnosti

Za ispitivanje utjecaja hormonske stimulacije na razinu ekspresije istraživanih gena (AMH, AMHR2, FSHR i AR) u stanicama kumulusa korišten je odgovarajući statistički test, odnosno ANOVA analiza varijanci. Od ukupno 129 uzoraka stanica kumulusa, 34 ih je dobiveno od pacijentica u modificiranom prirodnom ciklusu, 90 od

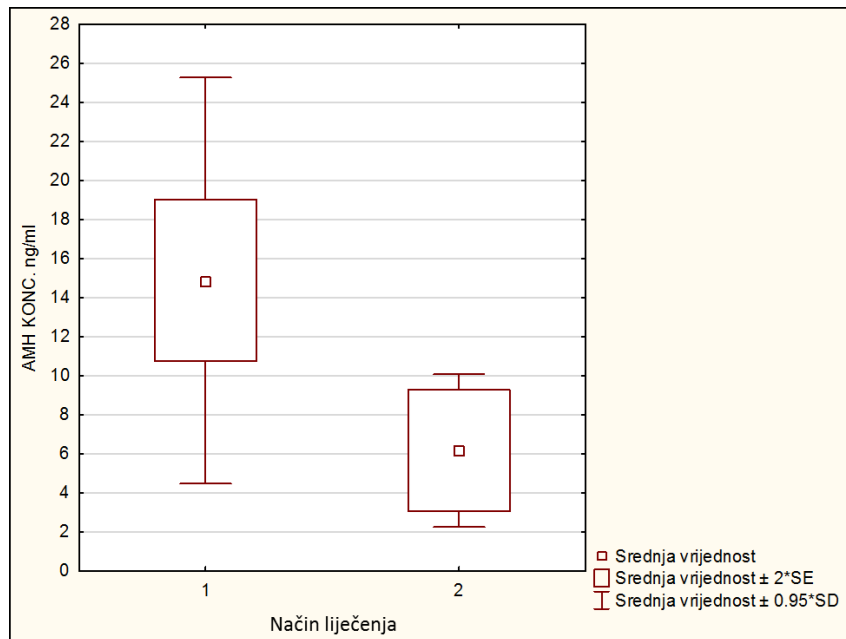
pacijentica stimuliranih antagonističkim, a 5 agonističkim protokolom stimulacije jajnika. Prije provođenja ANOVA analize ispitani su preduvjeti za primjenu ovog testa: normalnost distribucije podataka te homogenost varijanci pomoću Levene testa. Nije utvrđena statistički značajna razlika u ΔC_t vrijednostima istraživanih gena između skupina pacijentica stimuliranih različitim hormonskim protokolima (analiza varijanci – ANOVA; $p \geq 0.05$; tablica 12).

Tablica 12. ΔC_t vrijednosti gena AMH, AMHR2, FSHR i AR u stanicama kumulusa dobivenih od pacijentica stimuliranih različitim hormonskim protokolima.

	Analiza varijanci	p
AMH	F = 0.762	0.469
AMHR2	F = 1.519	0.223
FSHR	F = 2.344	0.100
AR	F = 0.258	0.773

F – izlazni parametar analize varijanci (ANOVA test); p – koeficijent statističke značajnosti

Od 35 uzoraka FF, kojima je određena koncentracija AMH u folikularnoj tekućini, njih 28 je bilo u modificiranom prirodnom ciklusu, 6 stimulirano antagonističkim, a 1 agonističkim protokolom hormonske stimulacije. Antagonistički i agonistički protokol su, s obzirom na mali broj slučajeva, promatrani zajedno te su kao grupa uspoređivani s grupom u modificiranom prirodnom ciklusu. Provedenim Mann Whitney U-testom nije utvrđena statistički značajna razlika među navedenim skupinama ($z = 1.505$; $p = 0.132$; slika 20). U uzorcima FF koji su dobiveni od pacijentica u hormonskoj stimulaciji uočena je manja koncentracija AMH, ali bez statistički značajne razlike u odnosu na FF dobivenu od pacijentica u modificiranom prirodnom ciklusu.



Slika 20. Razlika u koncentracijama ff AMH između skupina podvrgnutih različitim protokolima hormonske stimulacije. ff AMH – AMH u folikularnoj tekućini; 1 – modificirani prirodni ciklus; 2 – antagonistički ili agonistički protokol hormonske stimulacije.

4.6. Razlike u genskim ekspresijama AMH, AMHR2, FSHR i AR u stanicama kumulusa s obzirom na morfologiju jajne stanice, zigote i embrija te s obzirom na ishod MPO

Ukupno 129 jajnih stanica, 117 oplođenih jajnih stanica, odnosno zigota i 102 embrija (3. dan) podvrgnuto je statističkoj analizi povezanosti njihove morfologije s ekspresijom istraživanih gena. Oocyte, zigote i embriji su morfološki podijeljeni u dvije skupine: uzorke optimalne i uzorke suboptimalne morfologije. Suboptimalnom morfologijom smatrana je morfologija s bilo kojim uočenim nedostatkom. Stanice koje se iz različitih razloga nisu oplodile, kao ni zigote koje se nisu razvile do stadija embrija (3. dan), nisu uključene u daljnje procjenjivanje.

4.6.1. Razlike u ekspresijama istraživanih gena s obzirom na morfologiju jajne stanice

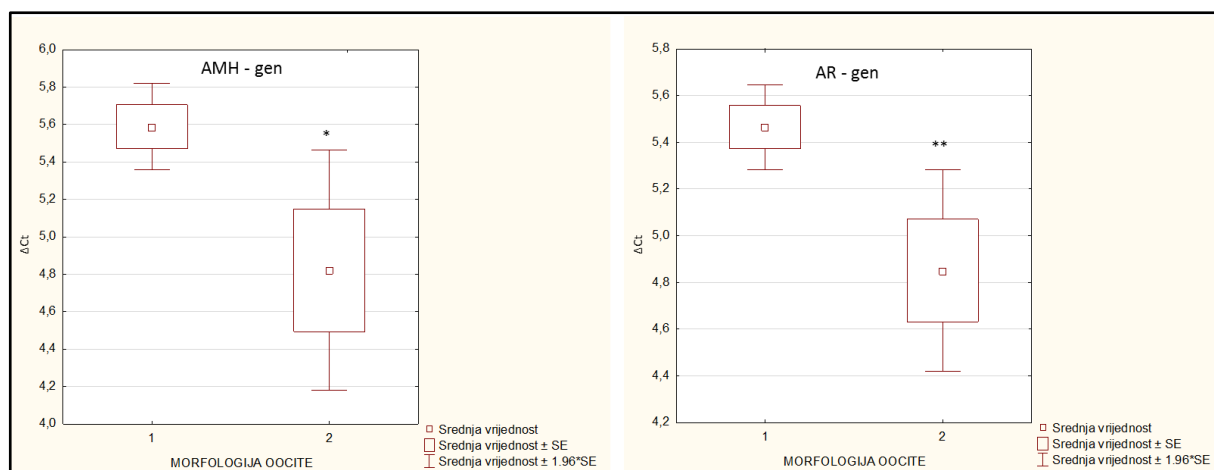
129 jajnih stanica uključenih u ICSI - postupak MPO podvrgnuto je morfološkom procjenjivanju te je njih 107 svrstano u skupinu optimalne, a njih 22 u skupinu suboptimalne morfologije. Suboptimalnim su smatrane nezrele i deformirane jajne stanice, te one s praznom ZP. Razlika između dvije skupine ispitana je t-testom za nezavisne uzorke, a značajnom je smatrana razlika ukoliko je $p < 0.05$ (tablica 13). Dobiveni rezultati ukazuju na to da je ekspresija AMH i AR veća u stanicama kumulusa koje okružuju jajnu stanicu suboptimalne morfologije (slika 21).

Tablica 13. Promjene genskih ekspresija AMH, AMHR2, FSHR i AR u stanicama kumulusa oocita optimalne (n = 107), odnosno suboptimalne morfologije (n = 22).

	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	p
AMH		
Oocita optimalne vs suboptimalne morfologije	1.703	0.011*
AMHR2		
Oocita optimalne vs suboptimalne morfologije	1.054	0.765
FSHR		
Oocita optimalne vs suboptimalne morfologije	1.298	0.109
AR		
Oocita optimalne vs suboptimalne morfologije	1.530	0.008*

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ – promjena ekspresije (eng. *fold change*); p – koeficijent statističke značajnosti;

* - $p < 0.05$



Slika 21. ΔC_t vrijednosti AMH - gena i AR - gena statistički su značajno više u stanicama kumulusa koje okružuju oocyte optimalne morfologije u odnosu na oocyte suboptimalne morfologije. 1 – optimalna morfologija; 2 – suboptimalna morfologija * – $p = 0.011$; ** – $p = 0.008$.

4.6.2. Razlike u ekspresijama istraživanih gena s obzirom na morfologiju zigote

Od 129 jajnih stanica uključenih u istraživanje, 117 je uspješno oplodeno te se nalazilo u stadiju zigote (oplođene jajne stanice). Neuspješna oplodnja može biti rezultat muškog faktora, primijenjene tehnike ili nepoznatog uzroka. Ukupno 73 oplođene jajne stanice svrstane su u skupinu optimalne, a njih 44 u skupinu suboptimalne morfologije. Suboptimalnim su smatrane oštećene zigote te zigote kod kojih je došlo do nepravilnosti u oplodnji. Razlika između dvije skupine ispitana je t-testom za nezavisne uzorke. Nije utvrđena statistički značajna razlika u ekspresijama istraživanih gena između zigota optimalne i suboptimalne morfologije ($p \geq 0.05$; tablica 14).

Tablica 14. Promjene genskih ekspresija AMH, AMHR2, FSHR i AR u stanicama kumulusa oocita od kojih su se razvile zigote optimalne (n = 73), odnosno suboptimalne morfologije (n = 44).

	2^{-ΔΔCt}	p
AMH		
Zigota optimalne vs suboptimalne morfologije	1.308	0.117
AMHR2		
Zigota optimalne vs suboptimalne morfologije	0.949	0.725
FSHR		
Zigota optimalne vs suboptimalne morfologije	0.961	0.753
AR		
Zigota optimalne vs suboptimalne morfologije	0.836	0.177
2 ^{-ΔΔCt} – promjena ekspresije (eng. <i>fold change</i>); p – koeficijent statističke značajnosti		

4.6.3. Razlike u ekspresijama istraživanih gena s obzirom na morfologiju embrija

Morfologija embrija ocjenjivana je treći dan od oplodnje. Do tog je stadija došlo ukupno 102 embrija, od čega je 29 ocijenjeno optimalnom morfologijom, a 73 suboptimalnom. Suboptimalnim su smatrani embriji s manje od 7 blastomera i/ili s fragmentacijom većom od 20%. Razlika između skupina ispitana je t-testom za nezavisne uzorke. Nije utvrđena statistički značajna razlika u ekspresiji istraživanih gena među navedenim skupinama ($p \geq 0.05$; tablica 15).

Tablica 15. Promjene genskih ekspresija AMH, AMHR2, FSHR i AR u stanicama kumulusa oocita od kojih su nastali embriji optimalne (n = 29), odnosno suboptimalne morfologije (n = 73).

	2^{-ΔΔCt}	p
AMH		
Embrij optimalne vs suboptimalne morfologije	0.904	0.624
AMHR2		
Embrij optimalne vs suboptimalne morfologije	1.087	0.629
FSHR		
Embrij optimalne vs suboptimalne morfologije	0.879	0.386
AR		
Embrij optimalne vs suboptimalne morfologije	0.984	0.917
2 ^{-ΔΔCt} – promjena ekspresije (eng. <i>fold change</i>); p – koeficijent statističke značajnosti		

4.6.4. Razlike u ekspresijama istraživanih gena s obzirom na ishod MPO

Od ukupno 129 uključenih jajnih stanica 11 ih je u periodu u kojem je obavljeno istraživanje rezultiralo uspostavljanjem biokemijske trudnoće, od čega je jedna trudnoća proizašla nakon prijenosa prethodno zamrznutog embrija. ET je izveden u ukupno 45 slučajeva, u 42 neposredno, dok je u tri slučaja izveden nakon odmrzavanja. U ukupno 84 slučajeva ET iz različitih razloga nije izveden: u 79 slučajeva ET nije uopće izveden dok je u 5 slučajeva zametak zamrznut te za vrijeme trajanja istraživanja nije izveden prijenos. Pomoću t-testa istraženo je postojanje povezanosti ekspresije svih istraživanih gena s izvođenjem ET i s konačnim ishodom MPO, odnosno sa začecem, te je utvrđeno da ne postoji nikakva statistički značajna povezanost ($p \geq 0.05$; tablica 16).

Tablica 16. Promjene genskih ekspresija AMH, AMHR2, FSHR i AR u stanicama kumulusa oocita koje su povezane s prijenosom zametka (n = 45) te začecem (n = 11).

	$2^{-\Delta\Delta C_t}$	p
AMH		
ET DA vs NE	1.211	0.234
Trudnoća DA vs NE	0.999	0.997
AMHR2		
ET DA vs NE	1.241	0.187
Trudnoća DA vs NE	1.151	0.553
FSHR		
ET DA vs NE	1.097	0.463
Trudnoća DA vs NE	1.140	0.551
AR		
ET DA vs NE	0.931	0.588
Trudnoća DA vs NE	1.142	0.543

ET – prijenos zametka; $2^{-\Delta\Delta C_t}$ – promjena ekspresije (eng. *fold change*); p – koeficijent statističke značajnosti

4.7. Razlike u koncentracijama AMH u folikularnoj tekućini s obzirom na morfologiju jajne stanice, zigote i embrija te s obzirom na ishod MPO

Oocyte, zigote i embriji su morfološki podijeljeni svaki u dvije skupine: uzorke optimalne i uzorke suboptimalne morfologije, pri čemu je suboptimalnom morfologijom smatrana morfologija s bilo kojim uočenim nedostatkom. Stanice koje se iz različitih razloga nisu oplodile, kao ni zigote koje se nisu razvile do stadija embrija (3. dan), nisu uključene u daljnje procjenjivanje. Ishod MPO praćen je kroz obavljanje ET te kroz utvrđivanje biokemijske trudnoće. S obzirom na nepravilnost raspodjele dobivenih podataka, za statističku analizu korišten je Mann Whitney U-test za utvrđivanje povezanosti nezavisnih uzoraka. Nije utvrđena statistički značajna povezanost koncentracije ff AMH ni sa jednim od istraživanih parametara (morfologija oocyte, zigote i embrija, ET te ustanovljenje trudnoće) ($p \geq 0.05$; tablica 17).

Tablica 17. Koncentracije AMH u folikularnoj tekućini s obzirom na morfologiju jajne stanice, zigote i embrija te ishod medicinski pomognute oplodnje, odnosno obavljanje ET i utvrđivanje biokemijske trudnoće.

	N	z, p
OOCITA		
Optimalna morfologija	31	z = -1.737
Suboptimalna morfologija	4	p = 0.082
ZIGOTA		
Optimalna morfologija	22	z = -1.199
Suboptimalna morfologija	10	p = 0.230
EMBRIJ		
Optimalna morfologija	11	z = -0.697
Suboptimalna morfologija	18	p = 0.486
ET		
Da	20	z = -1.017
Ne	15	p = 0.309
TRUDNOĆA		
Da	5	z = -0.354
Ne	30	p = 0.724

ET – prijenos zametka; z – izlazni parametar Mann Whitney testa; p – koeficijent statističke značajnosti

4.8. Povezanost koncentracije AMH u folikularnoj tekućini i genske ekspresije AMH, AMHR2, FSHR i AR u pripadajućim stanicama kumulusa

Provjera distribucije podataka pokazala je da su podaci dobiveni određivanjem koncentracije ff AMH nenormalno raspodijeljeni te su za izračun njihove povezanosti s ekspresijom istraživanih gena korišteni neparametrijski testovi: Spearman i Kendall tau test. Nije utvrđena statistički značajna povezanost između navedenih parametara ($p \geq 0.05$; tablica 18).

Tablica 18. Povezanost koncentracije AMH u folikularnoj tekućini i genske ekspresije AMH, AMHR2, FSHR i AR u pripadajućim stanicama kumulusa.

Povezanost koncentracije AMH i ekspresije sljedećih gena:	Spearman		Kendall tau	
	R	p	τ	p
AMH	-0.224	0.195	-0.166	0.160
AMHR2	0.042	0.809	0.025	0.831
FSHR	-0.129	0.461	-0.076	0.523
AR	-0.204	0.240	-0.143	0.227

R – Spearmanov koeficijent; τ – Kendall tau koeficijent; p – koeficijent statističke značajnosti

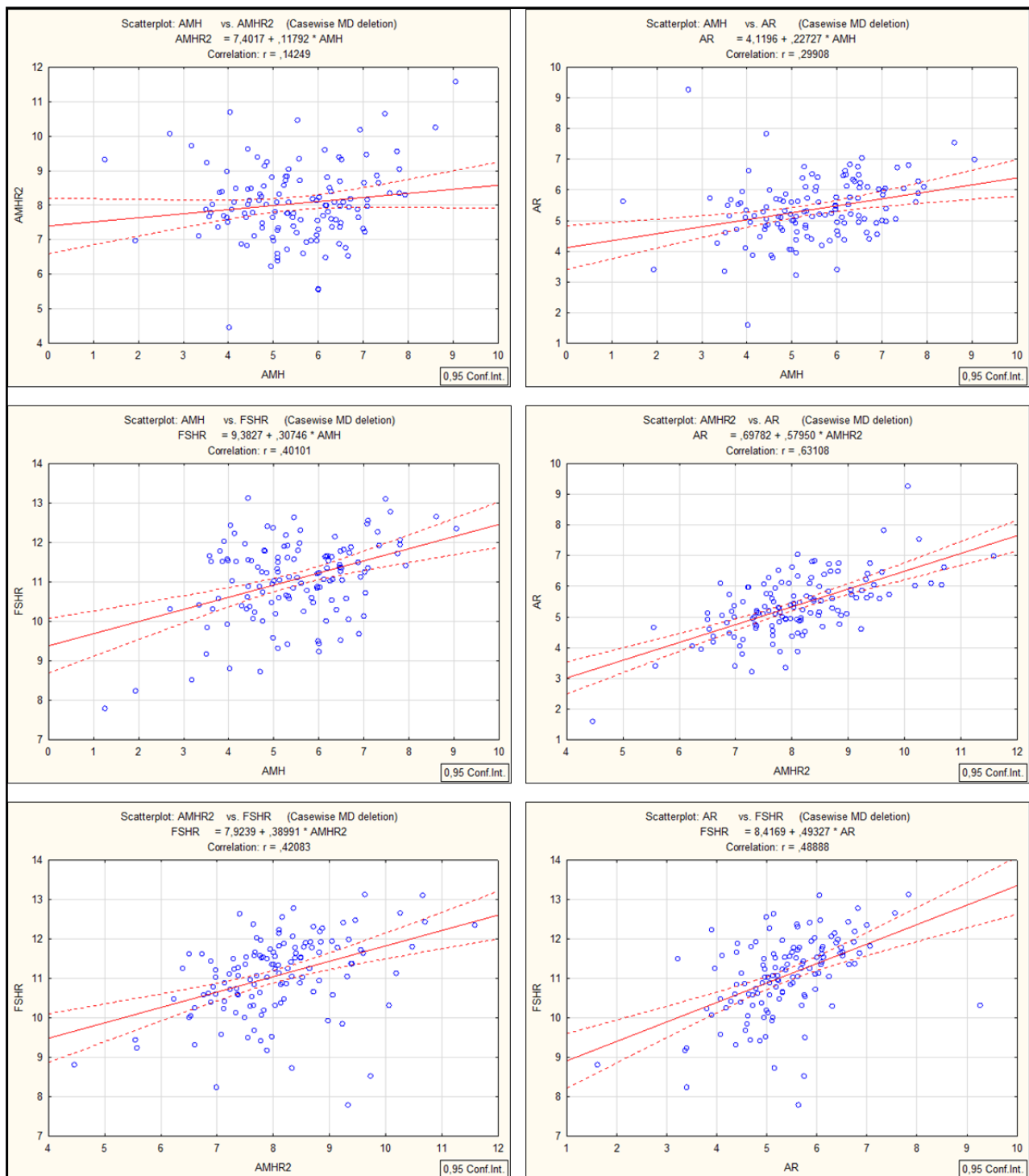
4.9. Utvrđivanje korelacija između genskih ekspresija AMH, AMHR2, FSHR i AR u stanicama kumulusa

Raspodjele podataka dobivenih analizom ekspresije istraživanih gena su normalne te je za analizu korelacija među navedenim podacima korištena Pearsonova korelacija. Podaci o povezanosti među ekspresijama istraživanih gena prikazani su u tablici 19 i na slici 22.

Tablica 19. Korelacije između genskih ekspresija AMH, AMHR2, FSHR i AR.

	AMH	AMHR2	FSHR	AR
AMH		$r = 0.14$	$r = 0.40$	$r = 0.30$
		$r^2 = 0.02$	$r^2 = 0.16$	$r^2 = 0.09$
		$p = 0.107$	$p < 0.001^*$	$p = 0.001^*$
AMHR2	$r = 0.14$		$r = 0.42$	$r = 0.63$
	$r^2 = 0.02$		$r^2 = 0.18$	$r^2 = 0.40$
	$p = 0.107$		$p < 0.001^*$	$p < 0.001^*$
FSHR	$r = 0.40$	$r = 0.42$		$r = 0.49$
	$r^2 = 0.16$	$r^2 = 0.18$		$r^2 = 0.24$
	$p < 0.001^*$	$p < 0.001^*$		$p < 0.001^*$
AR	$r = 0.30$	$r = 0.63$	$r = 0.49$	
	$r^2 = 0.09$	$r^2 = 0.40$	$r^2 = 0.24$	
	$p = 0.001^*$	$p < 0.001^*$	$p < 0.001^*$	

r – koeficijent korelacije; r^2 – koeficijent determinacije, interpretacija prema Petzu (nema povezanosti: $r^2 < 0.04$, slaba povezanost: $0.04 \leq r^2 < 0.15$, dobra povezanost: $0.16 < r^2 < 0.48$, jaka povezanost: $0.49 < r^2 < 0.98$); p – koeficijent statističke značajnosti; * - $p < 0.05$



Slika 22. Pravci regresije s jednađbom pravca i koeficijentom korelacije (r) za sve postojeće kombinacije ispitivanih varijabli.

Postojanje statistički značajne korelacije utvrđeno je između genskih ekspresija AMH i FSHR ($p < 0.001$) te između AMH i AR ($p = 0.001$). Osim navedenog, ekspresija AMHR2 - gena u statistički je značajnoj korelaciji s ekspresijom FSHR - gena ($p < 0.001$) i ekspresijom AR - gena ($p < 0.001$). Također, utvrđena je statistički značajna korelacija između genskih ekspresija FSHR i AR ($p < 0.001$). Za navedene je slučajeve određen i koeficijent determinacije (r^2) kao bolja mjera za ocjenu povezanosti varijabli. r^2 pruža informaciju o postotku podataka koji su u pravoj korelaciji jedan s drugim. Interpretacija vrijednosti koeficijenata korelacije i determinacije izvršena je prema Petzu te je između genskih ekspresija AMHR2 i FSHR te AR, kao i između FSHR i AMH te AR utvrđena dobra povezanost ($r^2 = 0.18$, $r^2 = 0.40$, $r^2 = 0.16$, $r^2 = 0.24$), dok je između ekspresija AMH i AR utvrđena slaba povezanost ($r^2 = 0.09$). Za povezanost između ekspresija AMH i AMHR2 nije utvrđena statistička značajnost, što dodatno potvrđuje i koeficijent determinacije ($p = 0.107$, $r^2 = 0.02$).

5. RASPRAVA

Za razvoj zdravog embrija i uspješnost postupka MPO od ključnog je značaja kvaliteta jajne stanice iz koje embrij nastaje (Rienzi i sur. 2012). Morfološka kvaliteta jajne stanice, posebno ona koja se određuje pri svakom postupku MPO tijekom rutinskog laboratorijskog rada, često nije dovoljna za predviđanje ishoda oplodnje i razvojnog potencijala te stanice (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology 2011, Swain i Pool 2008). Ocjenjivanje oocite koje se temelji isključivo na njenoj morfologiji ne pruža dovoljno informacija o mogućim intrinzičnim abnormalnostima stanice koje utječu na neadekvatan razvoj iz nje nastalog embrija (Swain i Pool 2008). S obzirom da svako manipuliranje i dodatno ispitivanje na jajnoj stanici može imati negativan učinak na njen fertilizacijski potencijal, njen mikrookoliš (stanice kumulusa i folikularna tekućina koje ju okružuju) logičan je izvor materijala pogodnog za istraživanja, a koji je nedvojbeno usko povezan s osobinama oocite (Dumesic i sur. 2015). Kako u završnim fazama sazrijevanja oocite, kao i tijekom oplodnje i ranog embrionalnog razvoja, sve dok embrij ne postane transkripcijski aktivan (u stadiju od 4 do 8 stanica) nema transkripcije, napredovanje staničnog ciklusa oslanja se na visoko regulirano prepisivanje prethodno uskladištenih majčinih mRNA (Susor i sur. 2016). Ta regulacija podrazumijeva dvosmjernu komunikaciju oocite i stanica kumulusa koje je okružuju, a ključna je za izlučivanje cijelog niza faktora nužnih za pravilan rast folikula, sazrijevanje oocite, ovulaciju jajne stanice sposobne za nastavak razvoja, oplodnju kao i kasniji razvoj ranog embrija (Cakmak i sur. 2016). Nastupanjem hormonske stimulacije koja dovodi do ovulacije, stanice kumulusa započinju slanje signala koji potiču oocitu na izlučivanje bioaktivnih molekula i translaciju, a što zauzvrat djeluje na stanice kumulusa regulirajući njihove funkcije i zatvarajući ovu regulacijsku petlju. Identificiranje najvažnijih molekula uključenih u navedene signalne puteve dovelo bi do razjašnjenja načina na koji oocita svojim rastom postaje razvojno kompetentna te bi nam otkrilo molekularne regulatore tih procesa (Burnik Papler i sur. 2015c).

Iz svega navedenog može se zaključiti da stanice kumulusa, koje su u neprekidnoj dvosmjernoj komunikaciji s oocitom, predstavljaju lako dostupan materijal koji se na neinvazivan način može iskoristiti za predviđanje kvalitete jajne stanice te je u posljednje vrijeme proveden niz istraživanja usmjeren ka pronalaženju gena čiji bi ekspresijski profil mogao poslužiti za predviđanje njenog fertilizacijskog potencijala

(Adriaenssens i sur. 2010, 2011, Al-Edani i sur. 2014, Assou i sur. 2010, Burnik Papler i sur. 2015a, 2015b, 2015c Cakmak i sur. 2016, Dumesic i sur. 2015, Lager i sur. 2013, Li i sur. 2013, Li i sur. 2015, Uyar i sur. 2013, Wathlet i sur. 2011, 2012, 2013). Iako je do sada ispitan velik broj gena, te je njihova ekspresija dovođena u vezu s različitim predviđanjima, bilo ishoda postupka MPO, razvojnog potencijala oocite i embrija i slično, rezultati dobiveni različitim istraživanjima nisu ujednačeni, a često su i proturječni. Različitim istraživanjima predložen je cijeli niz potencijalnih biomarkera, no niti jedan se od njih ne može izdvojiti kao pouzdan i siguran prediktor uspjeha postupka MPO (Burnik Papler i sur. 2015b). Neki od razloga za razilaženje u rezultatima mogu biti različitost krajnjih ciljeva koji su mjereni kao ishod u različitim istraživanjima, kao i razlike u laboratorijskom okolišu, korištenim tehnologijama ili osobinama uključenih ispitanika kao što su protokoli hormonske stimulacije tijekom postupaka MPO, dob ili dijagnoza neplodnosti (Burnik Papler i sur. 2015a, Uyar i sur. 2013).

Anti-Müllerov hormon, čija je genska ekspresija u stanicama kumulusa pripadajuće oocite, kao i ekspresija s njim povezanih receptora, obuhvaćena ovim istraživanjem do sada je dovođen u vezu s određivanjem ovarijske rezerve te s određivanjem broja primordijalnih folikula koji će nastaviti svoj razvoj (Durlinger i sur. 2002a, Fanchin i sur. 2003, Seifer i sur. 2002, van Rooij i sur. 2002). Ovim su istraživanjem ispitani ekspresijski profili AMH - gena, i s njim povezanih receptora: AMHR2, FSHR i AR te njihova povezanost s morfološki utvrđenom kvalitetom jajne stanice, zigote i embrija i konačnim ishodom postupka MPO (tablice 13, 14, 15 i 16; slika 21).

Cilj rada bio je utvrditi postojanje povezanosti genskih ekspresija AMH, AMHR2, FSHR i AR u stanicama kumulusa te koncentracija AMH u folikularnoj tekućini s morfološkom kvalitetom pripadajućih jajnih stanica, iz njih nastalih zigota i embrija. Ovim je istraživanjem utvrđena statistički značajna povezanost genske ekspresije AMH i AR u stanicama kumulusa i morfološke kvalitete pripadajuće jajne stanice i to takva da je u stanicama kumulusa suboptimalnih oocita utvrđena viša ekspresija navedenih gena ($2^{-\Delta\Delta Ct}(\text{AMH}) = 1.703$; $p = 0.011$ i $2^{-\Delta\Delta Ct}(\text{AR}) = 1.530$; $p = 0.008$; tablica 13; slika 21). U većini se dosad provedenih istraživanja AMH pozitivno povezuje s kvalitetom jajne stanice ili ishodom postupka MPO, te je i meta analiza iz 2014. godine utvrdila blagu pozitivnu korelaciju između AMH sa fertilizacijskim i implantacijskim

potencijalom oocite (Iliodromiti i sur. 2014). Unatoč tome, naš je rezultat u skladu s rezultatima dobivenim nedavnim istraživanjima kojima je utvrđena negativna korelacija između ekspresije AMH - gena u stanicama kumulusa i zrelosti pripadajuće jajne stanice, kao i povećana ekspresija AMH - gena u stanicama kumulusa unutar nezrelih folikula (Grøndahl i sur. 2011, Kedem-Dickman i sur. 2012). Osim navedenog, u posljednjem istraživanju naše grupe utvrđeno je postojanje statistički značajno više koncentracije ff AMH, u pacijentica mlađih od 35 godina, u MII oocitama kod kojih je izostala oplodnja nakon postupka MPO, a što također govori u prilog negativnog utjecaja viših razina AMH (Tramišak Milaković i sur. 2015).

Specifičan uzorak ekspresije AMH koji uključuje njegove niske razine u primarnim folikulima, postepeni rast u velikim preantralnim i malim antralnim folikulima, te ponovni pad razina AMH kako folikul nastavlja rast, ukazuje na važnost AMH za regulaciju broja rastućih folikula te za odabir folikula za ovulaciju (Andersen i sur. 2010, Hayes i sur. 2016, Weenen i sur. 2004). Kod visokih razina AMH, osjetljivost na FSH je smanjena, odnosno potrebna je veća razina FSH da bi folikul nastavio rast i razvoj i bio odabran za dominaciju (Durlinger i sur. 1999, 2001, 2002a, 2002b). Moguće je, dakle, da se upravo razinom AMH regulira sazrijevanje folikula koji u sebi sadrže kvalitetnu jajnu stanicu adekvatnog fertilizacijskog potencijala. U postupcima MPO, upotrebom hormonske stimulacije, potiče se sazrijevanje većeg broja folikula pa tako vjerojatno dolazi do sazrijevanja i folikula koji su visokom razinom AMH trebali biti spriječeni u daljnjem rastu i razvoju. Time se može objasniti utvrđena povezanost povišene ekspresije AMH - gena u stanicama kumulusa koje su okruživale morfološki lošije jajne stanice. Osim toga, povećana ekspresija AMH - gena u stanicama kumulusa lošijih oocita može ukazivati na nemogućnost navedenih stanica da nastave mejotičku diobu nakon zastoja, a takvo potencijalno djelovanje AMH kao inhibitora mejoze već je uočena na jajnim stanicama štakora (Takahashi i sur. 1986). Grøndahl i sur. su pokazali da, bez obzira na to što sazrijevanjem folikula dolazi do opadanja razine ekspresije AMH - gena u njegovim granuloza stanicama (uključujući i stanice kumulusa), u stanicama kumulusa zrelih preovulacijskih folikula još se uvijek može utvrditi određena razina ekspresije AMH - gena (Grøndahl i sur. 2011). To ukazuje na činjenicu da AMH ima ulogu u sazrijevanju oocite i finalnim stadijima folikulogeneze koja do sad još nije u potpunosti razjašnjena. Za razliku od istraživanja koje su proveli Kedem-Dickman i sur., u kojem je zrelost oocita procjenjivana prema prisutnosti prvog

polarnog tijela na temelju čega je jajna stanica smatrana MII oocitom, u našem je istraživanju optimalnom MII oocitom smatrana ona koja je, osim navedene karakteristike, imala zadovoljavajuću morfologiju svih šest dodatno ispitanih karakteristika (veličina i izgled PVS-a, veličina prvog polarnog tijela, raspored organela u citoplazmi, prisutnost sER diskova i vakuola u citoplazmi) (Kedem-Dickman i sur. 2012). Na ovaj se način pokušalo utvrditi postojanje razlika unutar relativno široke skupine MII oocita koje se u laboratoriju za MPO rutinski podvrgavaju oplodnji s vrlo različitim ishodom.

Ekspresija AR u stanicama kumulusa u većini je dosad provedenih istraživanja pozitivno povezivana s odvijanjem mitoze, a negativno s apoptozom granulosa stanica, što upućuje na njenu povezanost sa „zdravljem“ folikula (Vendola i sur. 1998, Weil i sur. 1999). Kako folikul raste dolazi do promjena u ekspresiji AR u granulosa stanicama, i to tako da je ona veća u ranim antralnim i preantralnim folikulima, nakon čega opada s daljnim rastom folikula (Rice i sur. 2007). Osim toga, u ranim folikulima ustanovljena je veća ekspresija AR, nego AMHR2 i FSHR što govori u prilog važnosti ovog receptora za rani folikularni razvoj. Utjecaj AR na „zdravlje“ folikula utvrdili su i Grøndahl i sur.: njihovim je istraživanjem utvrđena povećana ekspresija AR - gena u stanicama kumulusa nezrelih folikula u odnosu na zrele kao i pozitivna korelacija između ekspresije AMH i AR, što su rezultati koji su u skladu s dobivenima i našim istraživanjem (Grøndahl i sur. 2011). Uloga AR, i androgena općenito, u folikularnom razvoju još nije dovoljno razjašnjena. Poznato je da u žena, AR ima direktan učinak na održavanje plodnosti i to kroz optimiziranje uvjeta folikularnog rasta, razvoja i ovulacije, a dokazano je da čak i kratkotrajno povišene razine androgena u jajniku mogu dovesti do trajnih negativnih učinaka na folikule u razvoju (Walters i sur. 2007, 2010). Istraživanjem Walters i sur. iz 2010. godine na AR - *knock-out* miševima pokazano je da poremećaji u signalnim putevima koji uključuju AR mogu imati ulogu u neobjašnjenj anovulaciji. Lošija morfološka ocjena oocita koje su okružene stanicama kumulusa s povećanom ekspresijom AR - gena možda se može objasniti i mehanizmom djelovanja AR na stanicu, direktnim utjecajem na gensku transkripciju te indirektnim utjecajem na citoplazmatske proteine zadužene za prijenos signala, što može dovesti do poremećene komunikacije između stanica kumulusa i oocite, a time posljedično do lošije kvalitete jajne stanice (Heemers i Tindall 2007, Heinlein i Chang 2002).

Za razliku od utvrđene povezanosti s morfologijom oocite, genska ekspresija AMH i AR u stanicama kumulusa nije statistički značajno povezana s morfološkim ocjenama oplođenih jajnih stanica i iz njih nastalih embrija (tablice 14 i 15) što ukazuje na utjecaj AMH - gena i AR - gena na zrelost oocite, ali ne i na njen fertilizacijski potencijal kao ni na kvalitetu embrija koji će iz nje nastati.

Genska ekspresija AMHR2 i FSHR u stanicama kumulusa nije pokazala značajnu povezanost s morfološkim ocjenama jajnih stanica, zigota, niti embrija, kao niti s ishodom postupka MPO (tablice 13, 14, 15 i 16).

Osim ekspresije istraživanih gena u stanicama kumulusa, ispitivana je i povezanost koncentracije AMH u folikularnoj tekućini s morfologijom pripadajuće jajne stanice, iz nje nastale zigote i embrija (tablica 17). Statistički značajna razlika u ff AMH između različitih morfološki ocijenjenih oocita, zigota i embrija nije utvrđena. Slični su rezultati objavljeni i u većini prethodnih istraživanja, iako i među njima postoje određene proturječnosti (Fanchin i sur. 2007, Kedem-Dickman i sur. 2012, Takahashi i sur. 2008, Tramišak Milaković i sur. 2015). Kedem-Dickman i sur. su tako utvrdili povećanu koncentraciju AMH u folikularnoj tekućini folikula koji su sadržavali nezrelu jajnu stanicu dok su Takahashi i sur. pronašli pozitivnu korelaciju između ff AMH i uspješnosti oplodnje. Dosadašnja istraživanja Tramišak Milaković i sur. pokazala su pak da je, u pacijentica mlađih od 35 godina, ff AMH niži u folikulima koji su sadržavali MII oocitu koja je uspješno oplođena, u odnosu na folikule čija MII oocita nije uspješno oplođena. Razlike u dobivenim rezultatima većinom se mogu objasniti različitim ishodima istraživanja koji su ispitivani, dok se u slučaju utjecaja na uspješnost oplodnje u obzir mora uzeti i čitav niz faktora koji na nju mogu utjecati, kao što su sam postupak MPO, kvaliteta korištene sperme te karakteristike uključenih pacijentica. S obzirom na utjecaj velikog broja kofaktora na sastav folikularne tekućine, pa tako i na koncentraciju AMH u njoj, samo određivanje ff AMH za sada ne može poslužiti kao isključivi pokazatelj kvalitete jajne stanice koja je u tom folikulu sadržana.

Postoji li povezanost između ekspresije istraživanih gena u stanicama kumulusa i koncentracije AMH u folikularnoj tekućini pripadajućeg folikula? Prilikom ispitivanja povezanosti koncentracije AMH unutar folikularne tekućine i ekspresije gena za AMH u pripadajućim stanicama kumulusa, nije utvrđeno postojanje statistički značajne

korelacije (tablica 18). Istraživanjem iz 2013. Jeppesen i sur. su utvrdili postojanje povezanosti između ekspresije AMH - gena u granulosa stanicama i koncentracije AMH u folikularnoj tekućini kao i ukupne količine AMH u istoj folikularnoj tekućini, u malim antralnim folikulima, promjera do 8 mm (Jeppesen i sur. 2013). Rastom folikula, dolazi do povećanja volumena folikularne tekućine što dovodi do drastičnog pada koncentracije AMH u folikulima koji su veći od 8 mm. Kako je već ranije navedeno, ekspresija AMH doseže svoj maksimum u preantlnim i malim antralnim folikulima, dok je u primordijalnim i antralnim folikulima njegova razina nedetektibilna (Weenen i sur. 2004). S obzirom da su svi folikuli uključeni u naše istraživanje sakupljeni u kasnijim fazama njihovog razvoja (preovulacijski folikuli promjera i do 20 mm) kada je već došlo do pada koncentracije AMH u njima, nismo utvrdili postojanje statistički značajne povezanosti s ekspresijom AMH - mRNA u pripadajućim stanicama kumulusa. Mjerenje ukupne količine AMH sadržane unutar folikularne tekućine, neovisno o njenom volumenu, možda bi bila adekvatnija metoda za određivanje povezanosti u ovom slučaju, no tehnika prikupljanja folikularne tekućine tada bi morala biti takva da ne dozvoljava nikakve gubitke folikularne tekućine tijekom izolacije COC-a.

Ovakve neočekivane rezultate moguće je objasniti i različitim stupnjem iskorištenja AMH koji stanice kumulusa izlučuju u folikularnu tekućinu, od strane COC-a. Ovisno o potrebama COC-a za AMH-om dolazi do intrinzične regulacije njegove ekspresije tijekom folikulogeneze (Durlinger i sur. 2002b, Salmon i sur. 2004). Ukoliko je potreba za AMH-om povećana, to će potaknuti pojačanu ekspresiju gena, što vodi ka većoj produkciji samog hormona, no njegova koncentracija u trenutku mjerenja ne mora nužno biti povećana ukoliko je do tada već došlo do iskorištenja AMH za potrebe cijelog COC-a. Osim toga, ekspresija mRNA koja kodira za AMH ne mora nužno značiti i postojanje funkcionalnog proteina, uzimajući u obzir posttranslacijske modifikacije kao i formiranje sekundarnih i tercijarnih proteinskih struktura.

Najvjerojatnije iz istog razloga, odnosno zbog niske koncentracije AMH u folikularnoj tekućini većih preovulacijskih folikula, nije utvrđena povezanost ff AMH koncentracije s ekspresijom niti jednog od ostalih istraživanih gena (AMHR2, FSHR i AR) u pripadajućim stanicama kumulusa.

Ovim istraživanjem ispitali smo i postojanje korelacija između genskih ekspresija AMH, AMHR2, FSHR i AR u stanicama kumulusa. Istraživanjem korelacija ekspresija uključenih gena u stanicama kumulusa utvrđeno je postojanje dobre povezanosti ($r^2 > 0.16$; tablica 19) između ekspresija FSHR sa svim ostalim istraživanim genima (AMH, AMHR2 i AR), kao i između AMHR2 i AR, dok je između AMH i AR ustanovljeno postojanje slabe povezanosti ($0.04 < r^2 < 0.15$; tablica 19). Slični su rezultati utvrđeni i već spomenutim istraživanjem koje su proveli Jeppesen i sur. 2013. godine, no, kao što je prethodno istaknuto, njihovo je istraživanje provedeno na manjim, ranim antralnim folikulima (Jeppesen i sur. 2013).

Neočekivano, za razliku od rezultata prikazanih navedenim istraživanjem, ovim radom nije utvrđeno postojanje statistički značajne povezanost između ekspresija AMH i AMHR2 ($r^2 = 0.02$; $p = 0.107$; tablica 19). Sličan je rezultat prikazan i u istraživanju koje su 2008. proveli Catteau Jonard i sur., u kojem nije utvrđena nikakva povezanost između ekspresije AMH i AMHR2 u malim, ni u velikim folikulima uključenih pacijentica (Catteau-Jonard i sur. 2008). Istraživanjem iz 2007. godine koje su proveli Rice i sur. utvrđena je vrlo slaba ekspresija AMHR2 u preantralnim folikulima kada ekspresija AMH doseže svoj maksimum (Rice i sur. 2007). Ovi rezultati, zajedno s nedostatkom korelacije u ekspresiji AMH i AMHR2 koja je utvrđena ovim istraživanjem, mogu ukazivati na to da AMHR2 nije, kako se do sada mislilo, najvažniji receptor za AMH - signaliziranje (Durlinger i sur. 2002b, Mishina i sur. 1996). Kao i svi članovi TGF β - superobitelji, AMH signalizira putem receptora tipa I i II, od kojih je tip II ligand-specifičan, dok su receptori tipa I općenitiji, a aktiviraju se vezanjem AMH za receptor tipa II. Kao kandidati za receptore tipa I za AMH dosad su predloženi ALK2, ALK3 i ALK6 no njihove uloge kao ni mehanizam djelovanja nisu još dovoljno istraženi (Gouédard i sur. 2000, Kristensen i sur. 2014, Visser i sur. 2001, Visser i Themmen 2005). Moguće je da je važnost tip I receptora puno veća za AMH signaliziranje unutar folikula, nego što se to do sada smatralo.

Ostale utvrđene korelacije među ekspresijama istraživanih gena u stanicama kumulusa (tablica 19; slika 22) u skladu su s rezultatima dobivenim sličnim istraživanjima (Catteau-Jonard i sur. 2008, Grøndahl i sur. 2011, Jeppesen i sur. 2013).

Utvrđena korelacija između ekspresije AMH i FSHR ($r^2 = 0.16$; $p < 0.001$; tablica 19) rezultat je prethodno opisane fine ravnoteže između porasta ekspresije AMH i FSHR prije odabira folikula za dominaciju i pada njihove ekspresije u folikulima većeg

promjera (Jeppesen i sur. 2012a, 2012b). Međusobnu povezanost ekspresija ovih dvaju gena moguće je objasniti inhibiranjem FSH pomoću AMH ili pak utjecajem ekspresije AMH na porast ekspresije FSHR putem povećanja razine androgena (Jeppesen i sur. 2013). Posljednjoj teoriji u prilog idu i rezultati dobiveni istraživanjem Catteau-Jonard i sur. koji su utvrdili postojanje snažne povezanosti ekspresije AMH i FSHR u pacijentica sa sindromom policističnih jajnika, a koju su objasnili kao posljedicu hiperandrogenizma (Catteau-Jonard i sur. 2008).

Ekspresija AR već je prije dovođena u vezu sa „zdravljem“ folikula, a postojanje povezanosti s ekspresijom AMH ($r^2 = 0.09$; $p = 0.001$; tablica 19) upućuje na njihovu zajedničku ulogu u određivanju sudbine folikula (Grøndahl i sur. 2011, Jeppesen i sur. 2013, Vendola i sur. 1998). U istraživanju koje su proveli Hayes i sur. utvrđena je povišena ekspresija AR - gena u miševa tretiranih AMH-om (Hayes i sur. 2016). S obzirom da je AR uglavnom eksprimiran u malim folikulima, pretpostavlja se da je utjecaj AMH na ekspresiju AR rezultat povećanog broja malih folikula koji su zaostali u toj fazi upravo zbog visoke razine AMH, no nije razjašnjeno da li je taj učinak direktan ili indirektan (Hayes i sur. 2016, Prizant i sur. 2014).

Naši rezultati pokazuju postojanje korelacije između genskih ekspresija AR i FSHR ($r^2 = 0.24$; $p < 0.001$; tablica 19), što je u skladu se brojnim nedavnim istraživanjima kojima je utvrđeno postojanje uske povezanosti između AR i FSHR (Catteau-Jonard i sur. 2008, Nielsen i sur. 2011, Pan i sur. 2012, Weil i sur. 1999). Tako su Nielsen i sur. pokazali postojanje pozitivne povezanosti između ekspresije AR i FSHR u granuloza stanica malih antralnih folikula, a slični su rezultati utvrđeni i u istraživanjima koje su proveli Weil i sur. i Catteau Jonard i sur. Pan i sur. su pak pronašli negativnu korelaciju između ekspresija navedenih gena tijekom folikularne atrezije. Svi navedeni rezultati upućuju na postojanje veze među ekspresijama navedenih gena tijekom folikularnog razvoja. Nedavnim istraživanjem su Du i sur. utvrdili da AR ima važnu ulogu u ekspresiji FSHR koja je ostvarena novootkrivenim signalnim putem (Du i sur. 2016). Predloženi signalni put odvija se putem miR-126*, regulatorne mikro RNA (miRNA) molekule koju regulira AR, a koja djeluje na FSHR. U konačnici je AR inhibitorni regulator koji suprimira ekspresiju FSHR.

Povezanost ekspresije AR s ekspresijom AMHR2 ($r^2 = 0.40$; $p < 0.001$; tablica 18), kao i povezanost ekspresije FSHR s ekspresijom AMHR2 ($r^2 = 0.18$; $p < 0.001$; tablica 19), utvrđena ovim, ali i prethodnim istraživanjima, upućuje na moguću ulogu

AMH - signalnog puta u interakciji između ekspresije AR i FSHR (Grøndahl i sur. 2011, Nielsen i sur. 2010, 2011). Do sada nije utvrđeno utječe li AR direktno na ekspresiju AMHR2 - gena ili pak putem FSHR ili nekog drugog signalnog puta, ali su i AMH i njegov AMHR2 receptor vrlo vjerojatno uključeni u složenu regulaciju folikularnog rasta i razvoja.

Jedan od ciljeva ovog rada bio je istražiti utjecaj dobi pacijentica na morfologiju jajnih stanica, zigota i embrija, na razinu ekspresije istraživanih gena u stanicama kumulusa te na koncentraciju AMH u folikularnoj tekućini (tablice 9 i 10; slika 19). Povećanje životne dobi žene ima dokazan učinak na smanjenje njene plodnosti (Boivin i sur. 2007, Speroff 1994, Tan i sur. 2014). Sposobnost žene da ostvari trudnoću u jednom menstrualnom ciklusu počinje značajno opadati već u ranim tridesetim godinama, a pad se dodatno ubrzava daljnjim starenjem, tako da se već u žena životne dobi od 31 do 35 godina može uočiti pad, dok se u dobi od 35 do 39 godina čak jedna trećina žena suočava s poteškoćama začeća, a ta brojka raste do jedne polovine u dobi od 40 do 44 godine (Tan i sur. 2014). Razlozi za smanjenje plodnosti sa životnom dobi žene uključuju smanjenje ovarijske rezerve, pad kvalitete jajnih stanica, slabiji implantacijski potencijal nastalih embrija, te općenite hormonske promjene koje posljedično dovode do poremećaja u ovulaciji i promjena u maternici te do razvoja patoloških stanja kao što su endometrioza, infekcije i sl. (Hull i sur. 1996, Navot i sur. 1991, Speroff 1994, Tan i sur. 2014). Osim na mogućnost prirodnog začeća, dob žene ima značajan utjecaj i na uspješnost postupka MPO (Nyboe Andersen i sur. 2009). Svojim istraživanjem Tan i sur. utvrdili su dob od 30 godina kao granicu, nakon koje se uočava pad uspješnosti postupaka MPO, dok je istraživanjem koje su proveli Gleicher i sur. nakon dobi od 35 godina zamijećen značajan pad broja rođene djece nakon postupka MPO (Gleicher i sur. 2016, Tan i sur. 2014). Dobnu granicu od 35 godina, nakon koje dolazi do pada kvalitete jajnih stanica, u svojem istraživanju navode i Tsafirir i sur. (Tsafirir i sur. 2015). U našem istraživanju, srednja vrijednost životne dobi uključenih pacijentica iznosila je 35.5, a uključene su pacijentice dobi od 28 do 45 godina te smo ih, s obzirom na navedene karakteristike, podijelili na mlađe od 35 godina i one s 35 ili više godina.

Uzimajući u obzir morfološke ocjene jajnih stanica, oplođenih jajnih stanica i embrija nije ustanovljena statistički značajna razlika između prethodno navedenih

dobnih skupina uključenih pacijentica (tablica 9). Slični su rezultati utvrđeni i istraživanjem koje su proveli Tramišak Milaković i sur., a u kojem također nije ustanovljena razlika u morfološkim ocjenama oocita i zigota između mlađih i starijih pacijentica, no za razliku od našeg istraživanja, u navedenom je radu utvrđena statistički značajno bolja morfološka ocjena embrija u pacijentica mlađih od 35 godina (Tramišak Milaković i sur. 2015). Osim navedenog, u istraživanju koje su proveli Stensen i sur. također nije utvrđena statistički značajna povezanost morfološke kvalitete oocite sa životnom dobi pacijentice (Stensen i sur. 2010). Pojedina istraživanja utvrdila su postojanje razlika u pojavnosti specifičnih morfoloških karakteristika (kao npr. sER diskova, kortikalnih granula, vakuola ili pak specifične morfologije diobenog vretena i zone pelucide) između različitih dobnih skupina pacijentica, no u njima se ne povezuje ukupna morfološka ocjena, koja obuhvaća niz pojedinačnih morfoloških karakteristika, sa životnom dobi žene (Bianchi i sur. 2015, Korkmaz i sur. 2015). Nepostojanje statistički značajnih razlika između morfoloških ocjena jajnih stanica, zigota i embrija u različitim dobnim skupinama pacijentica navodi na zaključak da isključivo morfološko procjenjivanje nije dovoljno za utvrđivanje kvalitete i fertilizacijskog potencijala oocite, odnosno za procjenu kvalitete nastale zigote i embrija.

Ovim istraživanjem nije utvrđen statistički značajan utjecaj dobi na razinu ekspresije niti jednog od ispitivanih gena (tablica 10). Unatoč nepostojanju statističke značajnosti, ΔC_t vrijednosti AMH - gena bile su više u skupini pacijentica od 35 godina i starijih, u odnosu na one mlađe od 35 godina ($p = 0.250$; tablica 10). Više ΔC_t vrijednosti znače da je bio potreban veći broj ciklusa amplifikacije da bi se dosegla određena zadana vrijednost (eng. *threshold*), odnosno da je ekspresija gena bila niža u starijih pacijentica.

Prethodno je dokazano da s promjenom životne dobi dolazi do promjena u ekspresijama gena u stanicama kumulusa koji su dovođeni u vezu s kvalitetom jajne stanice (Al-Edani i sur. 2014, Lee i sur. 2010, McReynolds i sur. 2012). Ekspresija AMH pa i njegovog AMHR2 receptora u stanicama kumulusa prethodno je uglavnom dovođena u negativnu korelaciju s dobi žene, odnosno utvrđena je značajno manja ekspresija AMH - gena u žena starije životne dobi (Al-Edani i sur. 2014, Merhi i sur. 2013). Za razliku od toga, Kedem i sur. su utvrdili značajno povećanu ekspresiju AMH

- gena u granulosa stanicama, kao i koncentraciju AMH u folikularnoj tekućini, starijih pacijentica (Kedem i sur. 2014).

U skladu s rezultatima povezanosti ekspresije gena za AMH u stanicama kumulusa, koncentracija AMH u pripadajućoj folikularnoj tekućini također nije statistički značajno varirala između dvije različite dobne skupine pacijentica, iako su u pacijentica mlađe životne dobi utvrđene nešto više srednje vrijednosti koncentracije ff AMH, u odnosu na pacijentice starije životne dobi (slika 19). Slične su rezultate utvrdili i Yding Andersen i sur. koji su pronašli da vrijednosti koncentracije ff AMH ostaju nepromijenjene u svim uključenim dobnim skupinama ispitanica (Yding Andersen i sur. 2008). Za razliku od toga, u već spomenutom istraživanju koje su proveli Kedem i sur. koncentracija ff AMH u starijih pacijentica je bila značajno povećana, dok su potpuno suprotni rezultati utvrđeni istraživanjem koje su proveli Tramišak Milaković i sur. u kojem je značajno viša koncentracija ff AMH utvrđena u mlađih pacijentica (Kedem i sur. 2014, Tramišak Milaković i sur. 2015). Utvrđene razlike u rezultatima mogu biti ishod razlika u korištenoj metodologiji, odnosno mogu ovisiti o stadiju u kojem su se nalazili u istraživanje uključeni folikuli, s obzirom na promjene u koncentraciji AMH koje se događaju unutar njih za vrijeme ciklusa. Također, različita istraživanja koristila su različite podjele u dobne skupine što je također moglo imati utjecaja na konačni rezultat.

Ovakva razilaženja u rezultatima istraživanja moguće je objasniti činjenicom da ekspresija AMH u stanicama kumulusa, kao i njegova koncentracija u folikularnoj tekućini, zapravo podliježu promjenama koje se događaju unutar svakog ciklusa, rastom i razvojem svakog folikula te nisu toliko pod utjecajem dobi pacijentice. S obzirom na dosadašnju primjenu određivanja serumskog AMH kao biljega ovarijske rezerve, mogao bi se očekivati utjecaj dobi na njegovu ekspresiju, a posljedično i na njegovu koncentraciju u folikularnoj tekućini i u serumu. No, unatoč tome što ukupna koncentracija AMH u serumu opada s godinama, ona nije rezultat koncentracije, kao ni ekspresije AMH u svakom pojedinom folikulu, već, vjerojatnije, ukupnog broja folikula koji je veći u mlađih pacijentica. Smanjena koncentracija serumskog AMH u starijih pacijentica rezultat je smanjenog ukupnog broja folikula koji u svakom ciklusu rastu i sazrijevaju, a odgovorni za ukupnu koncentraciju AMH u serumu. Upravo iz tog razloga je razina serumskog AMH dobar pokazatelj ovarijske rezerve, no nema

nikakav utjecaj na razinu AMH u pojedinom folikulu, kao ni na kvalitetu pripadajuće jajne stanice.

Ovim je doktorskim radom istraživana i utjecaj hormonske stimulacije na morfologiju jajnih stanica, zigota i embrija, na razinu ekspresije istraživanih gena u stanicama kumulusa te na koncentraciju AMH u folikularnoj tekućini (tablice 11 i 12; slika 20). Pacijentice uključene u istraživanje bile su podvrgnute različitim protokolima hormonske stimulacije te su na temelju toga podijeljene u 3 različite skupine: pacijentice u modificiranom prirodnom ciklusu, pacijentice koje su primale terapiju antagonistima ili agonistima GnRH. Da bi se osigurala aspiracija što većeg broja zrelih oocita (MII), sve su pacijentice bile podvrgnute injekciji hCG-a koja izaziva konačno, tempirano, sazrijevanje jajnih stanica unutar folikula (Cole 2012, Katsikis i sur. 2006, Pacchiarotti i sur. 2016). Osim navedene injekcije, neke su od pacijentica primale i klomifen citrat, u kombinaciji s gonadotropinom. Klomifen citrat djeluje inhibitorno na estrogene receptore čime uzrokuje pad razine estrogena te dovodi do pojačanog izlučivanja GnRH, a rastom razina GnRH, dolazi do porasta razina gonadotropina (FSH i LH) (Kar 2012, Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine 2013, Schimberni i sur. 2016). Primjenjuje se početkom menstruacijskog ciklusa kada razine FSH prirodno rastu i dovode do razvoja novih folikula. Povećana razina endogenog FSH izazvana klomifen citratom uzrokuje istovremeni rast i sazrijevanje većeg broja folikula. Normalno bi ti folikuli izlučivanjem estrogena doveli do smanjenja izlučivanja GnRH-a, a time i gonadotropina (uključujući i FSH), no kako klomifen citrat inhibira estrogene receptore do toga ne dolazi, te bez obzira na broj folikula u razvoju i razinu estrogena, FSH ostaje povišen. Dodatni gonadotropini koje su dobivale pacijentice imaju sličan učinak, odnosno stimuliraju razvoj većeg broja folikula (Dickey i sur. 2002, Orvieto i sur. 2009, Pacchiarotti i sur. 2016). Pacijentice koje su bile stimulirane antagonistima ili agonistima GnRH također su, osim njih, primale i gonadotropin. Otpuštanje gonadotropina pod utjecajem je GnRH i to tako da GnRH stimulira sintezu i izlučivanje FSH i LH. Agonisti i antagonisti GnRH koriste se kako bi se spriječio prerani porast LH koji dovodi do prijevremene ovulacije (Bodri i sur. 2006, La Marca i Sunkara 2014). Korištenjem agonista GnRH onemogućuje se sinteza i izlučivanje endogenih gonadotropina, dok se korištenjem antagonista GnRH kompetitivno blokira djelovanje endogenog GnRH-a te se na taj način brže postiže

supresija izlučivanja gonadotropina. Najveći nedostatak korištenja GnRH - agonista je taj što prije postizanja smanjenja izlučivanja gonadotropina, dolazi do faze stimulacije i oslobađanja FSH i LH (tzv. *flare-up* učinak) zbog čega se sam postupak stimulacije produžuje (Mohsen i El Din 2013, Sunkara i sur. 2014).

Morfologija ispitivanih oocita, zigota i embrija, kao ni razina ekspresije istraživanih gena, te ff AMH, nisu se statistički značajno razlikovali ovisno o vrsti korištene hormonske stimulacije (tablice 11 i 12; slika 20).

U posljednje je vrijeme učinak primjene hormonske terapije na razinu genske ekspresije predmet brojnih istraživanja. Većinom istraživanja utvrđeno je postojanje utjecaja korištenja hormonske stimulacije na ekspresiju gena u stanicama kumulusa, dok je nekima utvrđeno čak i postojanje razlika u genskim ekspresijama ovisno o vrsti korištenih gonadotropina (Assou i sur. 2013, Adriaenssens i sur. 2010, Barberi i sur. 2012, Brannian i sur. 2010, de los Santos i sur. 2014, Devjak i sur. 2012, Fragouli i sur. 2014, Grøndahl i sur. 2009, Ola i Sun 2012). Ispitivanje razine genske ekspresije AMH u stanicama kumulusa u ovisnosti o primijenjenoj hormonskoj stimulaciji, prema našim saznanjima, dosad je provedeno samo jednim istraživanjem koje su 2013. proveli Agca i sur. na štakorima (Agca i sur. 2013). Navedenim je istraživanjem ustanovljeno da stimulacija GnRH - agonistima u štakora smanjuje ekspresiju gena uključenih u ekspanziju granulosa stanica, kao što su AMH, AMHR2 i FSHR, u odnosu na prirodni ciklus. Našim istraživanjem navedeni rezultati nisu potvrđeni, s obzirom da nije utvrđena statistički značajna razlika u razini ekspresije AMH - gena u stanicama kumulusa, ovisno o vrsti primijenjene hormonske terapije (tablica 12). Ostala istraživanja pronađena pregledom literature proučavala su razine serumskog AMH u ovisnosti o vrstama hormonskih stimulacija te su tako Böttcher i sur. utvrdili pad serumskog AMH tijekom stimulacije, dok su Kollmann i sur. utvrdili da su granulosa stanice dobivene nakon stimulacije gonadotropinima, izložene *in vitro* stimulaciji FSH-om, izlučivale manje AMH u odnosu na stanice iz prirodnog ciklusa (Böttcher i sur. 2014, Kollmann i sur. 2015). Za razliku od njih, Marschalek i sur. su utvrdili da dugoročna stimulacija GnRH - agonistima nema utjecaja na razinu serumskog AMH (Marschalek i sur. 2015). Kod svih ovih istraživanja treba imati na umu da je razina serumskog AMH u najvećoj mjeri rezultat ukupnog broja folikula, a ne pojedinačne ekspresije AMH u svakom od njih. Genske ekspresije AMHR2 i FSHR u stanicama kumulusa također su ispitane u već spomenutom istraživanju koje su na štakorima

proveli Agca i sur. gdje je uočeno smanjenje ekspresije AMHR2 i FSHR u stanicama dobivenih nakon stimulacije agonistima GnRH u odnosu na stanice iz prirodnog ciklusa (Agca i sur. 2013). Našim istraživanjem također nisu potvrđeni navedeni rezultati (tablica 12). Dobivene rezultate vezane za ekspresiju FSHR potrebno je tumačiti s oprezom s obzirom da je istraživanjem koje su proveli Ndiaye i sur. utvrđeno da primjena hCG-a (koji su primale sve pacijentice uključene u naše istraživanje) uzrokuje smanjenje ekspresije FSHR te je moguće da bi se rezultati razlikovali u slučaju da navedeni lijek nije primijenjen (Ndiaye i sur. 2005). Osim navedenog, postojanje različitih varijanti FSHR - gena, koje uključuju dva SNP-a (eng. *single nucleotide polymorphism*) te četiri različite varijante prekrajanja (eng. *splicing*), s dokazanim utjecajem na odgovor jajnika na stimulaciju FSH-om, a time i na plodnost i učinkovitost hormonske stimulacije također može imati utjecaj na dobivene rezultate te bi bilo zanimljivo provjeriti utjecaj navedenih varijanti na ekspresiju FSHR - gena (Gerasimova i sur. 2010, Karakaya i sur. 2014). Postojanje različitih polimorfničkih varijanti i njihovog utjecaja na hormonski profil, a time i na odgovor na hormonsku stimulaciju, dokazano je i za AMHR2 - gen te bi se također mogao provjeriti njihov utjecaj na razinu ekspresije ovog gena u stanicama kumulusa (Boudjenah i sur. 2012, Lazaros i sur. 2016). S obzirom da niti jedan od primijenjenih protokola hormonske stimulacije ne uključuje direktnu administraciju androgena, očekivano je nepostojanje utjecaja na ekspresiju AR, što je i potvrđeno našim rezultatima (tablica 12). Unatoč tome, utjecaj na ekspresiju ovog receptora moguć je i neizravnim djelovanjem te su tako Gleicher i sur. svojim radom prikazali postojanje potencijalne sinergije između AR i FSH tijekom ranog folikularnog razvoja, dok su Sánchez i sur. pak pronašli utjecaj dodatka FSH na povećanje ekspresije AR u mišjim stanicama kumulusa (Gleicher i sur. 2011, Sánchez i sur. 2010). Naši rezultati ipak ukazuju da primijenjene doze FSH nisu imale utjecaja na ekspresiju AR u stanicama kumulusa.

Rezultati dobiveni ovim istraživanjem po prvi put ukazuju na negativnu povezanost genske ekspresije AMH i AR u stanicama kumulusa s morfološkom kvalitetom jajne stanice iz istog COC-a. Upravo taj rezultat, uz ostale rezultate ovog istraživanja, omogućuje dodatno razjašnjenje potencijalne veze AMH i receptora koji su na direktni ili manje direktni način povezani s ovim hormonom, i morfološke kvalitete jajne stanice. Istraživanjem je potvrđena važnost kompleksa kumulusa i oocite,

odnosno komunikacije između jajne stanice i njenog mikrokoliša, za razvoj kvalitetne oocite koja je preduvjet za uspješnu oplodnju i nastanak kvalitetnog embrija. U svrhu daljnjeg razjašnjenja mehanizama potencijalnih interakcija između istraživanih gena i njihovog eventualnog utjecaja na kvalitetu jajne stanice potrebna su dodatna istraživanja, na većem broju uzoraka, koja bi uključivala ukupne ekspresijske profile stanica kumulusa uz određivanje ukupnog proteinskog sastava folikularne tekućine, u odnosu na kvalitetu jajne stanice.

6. ZAKLJUČCI

1. U stanicama kumulusa koje su okruživale jajnu stanicu suboptimalne morfološke ocjene utvrđena je statistički značajno viša genska ekspresija AMH i AR, dok se genske ekspresije AMH i AR ne razlikuju statistički značajno u morfološki različito ocjenjenim skupinama zigota i embrija, kao ni ovisno o ishodu postupka MPO (izvođenju prijenosa zametka i začecu), što ukazuje na utjecaj navedenih gena na zrelost jajne stanice, ali ne i na njen fertilizacijski potencijal, na kvalitetu embrija koji će iz nje nastati, kao ni na konačni ishod postupka MPO (izvođenje prijenosa zametka i začeca).
2. Genske ekspresije AMHR2 i FSHR u stanicama kumulusa nisu statistički značajno povezane s morfološkim ocjenama jajnih stanica, zigota niti embrija, kao ni s ishodom postupka MPO (izvođenjem prijenosa zametka i začecem).
3. Koncentracija AMH u folikularnoj tekućini nije statistički značajno povezana s morfologijom pripadajuće oocite, zigote ni embrija, kao ni s ishodom postupka MPO (izvođenjem prijenosa zametka i začecem) što ukazuje da ff AMH nije adekvatan isključivi pokazatelj kvalitete pripadajuće jajne stanice, njenog fertilizacijskog potencijala kao ni kvalitete iz nje nastalog embrija.
4. Životna dob uključenih pacijentica nije imala statistički značajan utjecaj na razinu ekspresije AMH - gena u stanicama kumulusa, kao ni na koncentraciju AMH u folikularnoj tekućini što navodi na zaključak da ukupna koncentracija AMH u serumu, koja je pokazatelj ovarijske rezerve, nije rezultat koncentracije niti genske ekspresije AMH u svakom pojedinačnom folikulu, već je rezultat ukupnog broja folikula koji je veći u mlađih žena.
5. Životna dob uključenih pacijentica nije imala statistički značajan utjecaj na morfološke ocjene jajnih stanica, zigota i embrija, kao ni na razine genskih ekspresija AMHR2, FSHR i AR u stanicama kumulusa niti na ishod postupka MPO (izvođenje prijenosa zametka i začeca), što je vjerojatno utjecaj vanjske hormonske stimulacije.
6. Protokol hormonske stimulacije kojem su podvrgnute pacijentice nije imao statistički značajan utjecaj na morfološke ocjene jajnih stanica, zigota i embrija, kao ni na razine genskih ekspresija AMH, AMHR2, FSHR i AR u stanicama kumulusa, koncentraciju AMH u folikularnoj tekućini niti na ishod postupka MPO (izvođenje prijenosa zametka i začeca).

7. Koncentracija AMH u folikularnoj tekućini nije statistički značajno povezana s genskim ekspresijama AMH, AMHR2, FSHR i AR u pripadajućim stanicama kumulusa, što potencijalno ukazuje na iznimno niske koncentracije u preovulacijskim folikulima kakvi su uključeni u istraživanje.
8. Utvrđene su slijedeće statistički značajne korelacije ekspresija istraživanih gena u stanicama kumulusa: ekspresija AMH - gena s genskim ekspresijama FSHR i AR, ekspresija AMHR2 - gena s genskim ekspresijama FSHR i AR i ekspresija FSHR - gena je s ekspresijom AR - gena. Nedostatak korelacije između genskih ekspresija AMH i AMHR2 mogući je pokazatelj potencijalno veće važnosti receptora tipa I za AMH – signaliziranje unutar folikula, nego što je to do sada smatrano.

7. LITERATURA

- [1] Adriaenssens T, Wathlet S, Segers I, Verheyen G, De Vos A, Van der Elst J, Coucke W, Devroey P, Smits J. 2010. "Cumulus cell gene expression is associated with oocyte developmental quality and influenced by patient and treatment characteristics." *Hum Reprod*, 25: 1259-70.
- [2] Adriaenssens T, Segers I, Wathlet S, Smits J. 2011. "The cumulus cell gene expression profile of oocytes with different nuclear maturity and potential for blastocyst formation." *J Assist Reprod Genet*, 28: 31-40.
- [3] Agarwal A, Aponte-Mellado A, Premkumar BJ, Shaman A, Gupta S. 2012. "The effects of oxidative stress on female reproduction: a review." *Reprod Biol Endocrinol*, 29; 10:49.
- [4] Agca C, Yakan A, Agca Y. 2013. "Estrus synchronization and ovarian hyperstimulation treatments have negligible effects on cumulus oocyte complex gene expression whereas induction of ovulation causes major expression changes." *Mol Reprod Dev*, 80: 102-17.
- [5] Albertini DF, Combelles CM, Benecchi E, Carabatsos MJ. 2001. "Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development." *Reproduction*, 121: 647-53.
- [6] Al-Edani T, Assou S, Ferrières A, Bringer Deutsch S, Gala A, Lecellier CH, Aït-Ahmed O, Hamamah S. 2014. "Female aging alters expression of human cumulus cells genes that are essential for oocyte quality." *Biomed Res Int*, 2014 :964614.
- [7] Alexander H, Zimmermann G, Woltersdörfer GW, Biesold C, Lehmann M, Eickenkel J, Pretzsch G, Baier D. 1998. "Utero-ovarian interaction in the regulation of reproductive function." *Hum Reprod Update*, 4: 550-9.
- [8] Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. 2011. "The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting." *Hum Reprod*, 26: 1270-83.
- [9] Ambekar AS, Nirujogi RS, Srikanth SM, Chavan S, Kelkar DS, Hinduja I, Zaveri K, Prasad TS, Harsha HC, Pandey A, Mukherjee S. 2013. "Proteomic analysis of

human follicular fluid: a new perspective towards understanding folliculogenesis.” *J Proteomics*, 87: 68-77.

- [10] Ambriović Ristov, A. 2007. *Metode u molekularnoj biologiji*. Zagreb: Institut Ruđer Bošković.
- [11] Andersen CY, Schmidt KT, Kristensen SG, Rosendahl M, Byskov AG, Ernst E. 2010. “Concentrations of AMH and inhibin-B in relation to follicular diameter in normal human small antral follicles.” *Hum Reprod*, 25: 1282-7.
- [12] Angelucci S, Ciavardelli D, Di Giuseppe F, Eleuterio E, Sulpizio M, Tiboni GM, Giampietro F, Palumbo P, Di Ilio C. 2006. “Proteome analysis of human follicular fluid.” *Biochim Biophys Acta*, 1764: 1775-85.
- [13] Arce JC, La Marca A, Mirner Klein B, Nyboe Andersen A, Fleming R. 2013. “Antimüllerian hormone in gonadotropin releasing-hormone antagonist cycles: prediction of ovarian response and cumulative treatment outcome in good-prognosis patients.” *Fertil Steril*, 99: 1644-53.
- [14] Asatiani K, Gromoll J, Eckardstein SV, Zitzmann M, Nieschlag E, Simoni M. 2002. “Distribution and function of FSH receptor genetic variants in normal men.” *Andrologia*, 34: 172-6.
- [15] Assou S, Al-edani T, Haouzi D, Philippe N, Lecellier CH, Piquemal D, Commes T, Aït-Ahmed O, Dechaud H, Hamamah S. 2013. “MicroRNAs: new candidates for the regulation of the human cumulus-oocyte complex.” *Hum Reprod*, 28: 3038-49.
- [16] Assou S, Haouzi D, De Vos J, Hamamah S. 2010. “Human cumulus cells as biomarkers for embryo and pregnancy outcomes.” *Mol Hum Reprod*, 16: 531-8.
- [17] Assou S, Haouzi D, Dechaud H, Gala A, Ferrières A, Hamamah S. 2013. “Comparative gene expression profiling in human cumulus cells according to ovarian gonadotropin treatments.” *Biomed Res Int*, 2013: 354582.
- [18] Baarends WM, Uilenbroek JT, Kramer P, Hoogerbrugge JW, van Leeuwen EC, Themmen AP, Grootegoed JA. 1995. “Anti-müllerian hormone and anti-müllerian hormone type II receptor messenger ribonucleic acid expression in rat ovaries

during postnatal development, the estrous cycle, and gonadotropin-induced follicle growth." *Endocrinology*, 136: 4951-62.

- [19] Baerwald AR, Adams GP, Pierson RA. 2012. "Ovarian antral folliculogenesis during the human menstrual cycle: a review." *Hum Reprod Update* 18: 73-91.
- [20] Baker, TG. 1963. "A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries." *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 158: 417-33.
- [21] Balaban B, Urman B. 2006. "Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation." *Reprod Biomed Online*, 12: 608-15.
- [22] Balakier H, Bouman D, Sojecki A, Librach C, Squire JA. 2002. "Morphological and cytogenetic analysis of human giant oocytes and giant embryos." *Hum Reprod*, 17: 2394-401.
- [23] Barber RD, Harmer DW, Coleman RA, Clark BJ. 2005. "GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues." *Physiol Genomics*, 21: 389-95.
- [24] Barberi M, Ermini B, Morelli MB, Ermini M, Cecconi S, Canipari R. 2012. "Follicular fluid hormonal profile and cumulus cell gene expression in controlled ovarian hyperstimulation with recombinant FSH: effects of recombinant LH administration." *J Assist Reprod Genet*, 29: 1381-91.
- [25] Bedaiwy MA, Elnashar SA, Goldberg JM, Sharma R, Mascha EJ, Arrigain S, Agarwal A, Falcone T. 2012. "Effect of follicular fluid oxidative stress parameters on intracytoplasmic sperm injection outcome." *Gynecol Endocrinol*, 28: 51-5.
- [26] Bencomo E, Pérez R, Arteaga MF, Acosta E, Peña O, Lopez L, Avila J, Palumbo A. 2006. "Apoptosis of cultured granulosa-lutein cells is reduced by insulin-like growth factor I and may correlate with embryo fragmentation and pregnancy rate." *Fertil Steril*, 85: 474-80.
- [27] Bentov Y, Yavorska T, Esfandiari N, Jurisicova A, Casper RF. 2011. "The contribution of mitochondrial function to reproductive aging." *J Assist Reprod Genet*, 28: 773-83.
- [28] Bergandi L, Basso G, Evangelista F, Canosa S, Dalmasso P, Aldieri E, Revelli A, Benedetto C, Ghigo D. 2014. "Inducible nitric oxide synthase and heme

oxygenase 1 are expressed in human cumulus cells and may be used as biomarkers of oocyte competence." *Reprod Sci*, 21: 1370-7.

- [29] Bianchi L, Gagliardi A, Campanella G, Landi C, Capaldo A, Carleo A, Armini A, De Leo V, Piomboni P, Focarelli R, Bini L. 2013. "A methodological and functional proteomic approach of human follicular fluid en route for oocyte quality evaluation." *J Proteomics*, 90: 61-76.
- [30] Bianchi S, Macchiarelli G, Micara G, Linari A, Boninsegna C, Aragona C, Rossi G, Cecconi S, Nottola SA. 2015. "Ultrastructural markers of quality are impaired in human metaphase II aged oocytes: a comparison between reproductive and in vitro aging." *J Assist Reprod Genet*, 32: 1343-58.
- [31] Bodri D, Vernaev V, Guillén JJ, Vidal R, Figueras F, Coll O. 2006. "Comparison between a GnRH antagonist and a GnRH agonist flare-up protocol in oocyte donors: a randomized clinical trial." *Hum Reprod*, 21: 2246-51.
- [32] Boivin J, Bunting L, Collins JA, Nygren KG. 2007. "International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care." *Hum Reprod*, 22: 1506-12.
- [33] Böttcher B, Tsybulyak I, Grubinger T, Wildt L, Seeber B. 2014. "Dynamics of anti-Müllerian hormone during controlled ovarian stimulation." *Gynecol Endocrinol*, 30: 121-5.
- [34] Boudjenah R, Molina-Gomes D, Torre A, Bergere M, Bailly M, Boitrelle F, Taieb S, Wainer R, Benahmed M, de Mazancourt P, Selva J, Vialard F. 2012. "Genetic polymorphisms influence the ovarian response to rFSH stimulation in patients undergoing in vitro fertilization programs with ICSI." *PLoS One*, 7: e38700.
- [35] Brannian J, Eyster K, Mueller BA, Bietz MG, Hansen K. 2010. "Differential gene expression in human granulosa cells from recombinant FSH versus human menopausal gonadotropin ovarian stimulation protocols." *Reprod Biol Endocrinol*, 8: 25.
- [36] Brinkmann AO, Klaasen P, Kuiper GG, van der Korput JA, Bolt J, de Boer W, Smit A, Faber PW, van Rooij HC, Geurts van Kessel A, Voorhorst MM, Mulder E, Trapman J. 1989. "Structure and function of the androgen receptor." *Urol Res*, 17: 87-93.

- [37] Brodin T, Hadziosmanovic N, Berglund L, Olovsson M, Holte J. 2013. "Antimüllerian hormone levels are strongly associated with live-birth rates after assisted reproduction." *J Clin Endocrinol Metab*, 98: 1107-14.
- [38] Broekmans FJ, Kwee J, Hendriks DJ, Mol BW, Lambalk CB. 2006. "A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome." *Hum Reprod Update*, 12: 685-718.
- [39] Burnik Papler T, Vrtacnik Bokal E, Lovrecic L, Kopitar AN, Maver A. 2015a. "No specific gene expression signature in human granulosa and cumulus cells for prediction of oocyte fertilisation and embryo implantation." *PLoS One*, 10: e0115865.
- [40] Burnik Papler T, Vrtačnik Bokal E, Maver A, Lovrečić L. 2015b. "Specific gene expression differences in cumulus cells as potential biomarkers of pregnancy." *Reprod Biomed Online*, 30: 426-33.
- [41] Burnik Papler T, Vrtacnik Bokal E, Maver A, Kopitar AN, Lovrečić L. 2015c. "Transcriptomic Analysis and Meta-Analysis of Human Granulosa and Cumulus Cells." *PLoS One*, 10: e0136473.
- [42] Cakmak H, Franciosi F, Zamah AM, Cedars MI, Conti M. 2016. "Dynamic secretion during meiotic reentry integrates the function of the oocyte and cumulus cells." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113: 2424-9.
- [43] Cate RL, Mattaliano RJ, Hession C, Tizard R, Farber NM, Cheung A, Ninfa EG, Frey AZ, Gash DJ, Chow EP, Fisher RA, Bertonis JM, Torres G, Wallner BP, Ramachandran KL, Ragin RC, Manganaro TF, MacLaughlin DT, Donahoe PK. 1986. "Isolation of the bovine and human genes for Müllerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells." *Cell*, 45: 685-98.
- [44] Catteau-Jonard S, Jamin SP, Leclerc A, Gonzalès J, Dewailly D, di Clemente N. 2008. "Anti-Müllerian hormone, its receptor, FSH receptor, and androgen receptor genes are overexpressed by granulosa cells from stimulated follicles in women with polycystic ovary syndrome." *J Clin Endocrinol Metab*, 93: 4456-61.
- [45] Chabbert Buffet N, Djakoure C, Maitre SC, Bouchard P. 1998. "Regulation of the human menstrual cycle." *Front Neuroendocrinol*, 19: 151-86.

- [46] Cheng EH, Chen SU, Lee TH, Pai YP, Huang LS, Huang CC, Lee MS. 2013. "Evaluation of telomere length in cumulus cells as a potential biomarker of oocyte and embryo quality." *Hum Reprod*, 28: 929-36.
- [47] Cillo F, Brevini TA, Antonini S, Paffoni A, Ragni G, Gandolfi F. 2007. "Association between human oocyte developmental competence and expression levels of some cumulus genes." *Reproduction*, 134: 645-50.
- [48] Cohen Y, Malcov M, Schwartz T, Mey-Raz N, Carmon A, Cohen T, Lessing JB, Amit A, Azem F. 2004. "Spindle imaging: a new marker for optimal timing of ICSI?" *Hum Reprod*, 19: 649-54.
- [49] Cole, LA. 2012. "hCG, the wonder of today's science." *Reprod Biol Endocrinol*, 10: 24.
- [50] Collins JA, Van Steirteghem A. 2004. "Overall prognosis with current treatment of infertility." *Hum Reprod Update* 10: 309-16.
- [51] Cooper GM, Hausman RE. 2004. *Stanica, molekularni pristup*. Zagreb: Medicinska naklada.
- [52] Costagliola S, Panneels V, Bonomi M, Koch J, Many MC, Smits G, Vassart G. 2002. "Tyrosine sulfation is required for agonist recognition by glycoprotein hormone receptors." *EMBO J*, 21: 504-13.
- [53] Crosignani PG, Rubin BL. 2000. "Optimal use of infertility diagnostic tests and treatments. The ESHRE Capri Workshop Group. ." *Hum Reprod* 15: 723-32.
- [54] Dandekar P, Talbot P. 1992. "Perivitelline space of mammalian oocytes: extracellular matrix of unfertilized oocytes and formation of a cortical granule envelope following fertilization." *Mol Reprod Dev* 31: 135-43.
- [55] Davison SL, Bell R. 2006. "Androgen physiology." *Semin Reprod Med*, 24: 71-7.
- [56] de los Santos MJ, García-Láez V, Beltrán-Torregrosa D, Horcajadas JA, Martínez-Conejero JA, Esteban FJ, Pellicer A, Labarta E. 2012. "Hormonal and molecular characterization of follicular fluid, cumulus cells and oocytes from pre-ovulatory follicles in stimulated and unstimulated cycles." *Hum Reprod*, 27: 1596-605.

- [57] Devjak R, Fon Tacer K, Juvan P, Virant Klun I, Rozman D, Vrtačnik Bokal E. 2012. "Cumulus cells gene expression profiling in terms of oocyte maturity in controlled ovarian hyperstimulation using GnRH agonist or GnRH antagonist." *PLoS One*, 7: e47106.
- [58] Dickey RP, Thornton M, Nichols J, Marshall DC, Fein SH, Nardi RV, and Bravelle IVF Study Group. 2002. "Comparison of the efficacy and safety of a highly purified human follicle-stimulating hormone (Bravelle) and recombinant follitropin-beta for in vitro fertilization: a prospective, randomized study." *Fertil Steril*, 77: 1202-8.
- [59] Du X, Li Q, Pan Z, Li Q. 2016. "Androgen receptor and miRNA-126* axis controls follicle-stimulating hormone receptor expression in porcine ovarian granulosa cells." *Reproduction*, 152: 161-9.
- [60] Dumesic DA, Meldrum DR, Katz-Jaffe MG, Krisher RL, Schoolcraft WB. 2015. "Oocyte environment: follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health." *Fertil Steril*, 103: 303-16.
- [61] Dunning KR, Russell DL, Robker RL. 2014. "Lipids and oocyte developmental competence: the role of fatty acids and β -oxidation." *Reproduction*, 148: 15-27.
- [62] Durlinger AL, Kramer P, Karels B, de Jong FH, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP. 1999. "Control of primordial follicle recruitment by anti-Müllerian hormone in the mouse ovary." *Endocrinology*, 140: 5789-96.
- [63] Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Kumar TR, Matzuk MM, Rose UM, de Jong FH, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP. 2001. "Anti-Müllerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary." *Endocrinology*, 142: 4891-9.
- [64] Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Ingraham HA, Nachtigal MW, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP. 2002a. "Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary." *Endocrinology*, 143: 1076-84.
- [65] Durlinger AL, Visser JA, Themmen AP. 2002b. "Regulation of ovarian function: the role of anti-Müllerian hormone." *Reproduction*, 124: 601-9.

- [66] Ebner T, Moser M, Tews G. 2006. "Is oocyte morphology prognostic of embryo developmental potential after ICSI?" *Reprod Biomed Online*, 12: 507-12.
- [67] Ebner T, Shebl O, Moser M, Sommergruber M, Tews G. 2008. "Developmental fate of ovoid oocytes." *Hum Reprod*, 23: 62-6.
- [68] Ebner T, Balaban B, Moser M, Shebl O, Urman B, Ata B, Tews G. 2010. "Automatic user-independent zona pellucida imaging at the oocyte stage allows for the prediction of preimplantation development." *Fertil Steril*, 94: 913-20.
- [69] Eppig, JJ. 2001. "Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals." *Reproduction* 122: 829-38.
- [70] Fanchin R, Schonäuer LM, Righini C, Frydman N, Frydman R, Taieb J. 2003. "Serum anti-Müllerian hormone dynamics during controlled ovarian hyperstimulation." *Hum Reprod*, 18: 328-32.
- [71] Fanchin R, Mendez Lozano DH, Frydman N, Gougeon A, di Clemente N, Frydman R, Taieb J. 2007. "Anti-Müllerian hormone concentrations in the follicular fluid of the preovulatory follicle are predictive of the implantation potential of the ensuing embryo obtained by in vitro fertilization." *J Clin Endocrinol Metab*, 92: 1796-802.
- [72] Fancsovits P, Tóthné ZG, Murber A, Takács FZ, Papp Z, Urbancsek J. 2006. "Correlation between first polar body morphology and further embryo development." *Acta Biol Hung*, 57: 331-8.
- [73] Feuerstein P, Puard V, Chevalier C, Teusan R, Cadoret V, Guerif F, Houlgatte R, Royere D. 2012. "Genomic assessment of human cumulus cell marker genes as predictors of oocyte developmental competence: impact of various experimental factors." *PLoS One*, 7: e40449.
- [74] Fortune JA, Cushman RA, Wahl CM, Kito S. 2000. "The primordial to primary follicle transition." *Mol Cell Endocrinol* 163: 53-60.
- [75] Fragouli E, Lalioti MD, Wells D. 2014. "The transcriptome of follicular cells: biological insights and clinical implications for the treatment of infertility." *Hum Reprod Update*, 20: 1-11.

- [76] Gérard N, Loiseau S, Duchamp G, Seguin F. 2002. "Analysis of the variations of follicular fluid composition during follicular growth and maturation in the mare using proton nuclear magnetic resonance (^1H NMR)." *Reproduction*, 124: 241-8.
- [77] Gerasimova T, Thanasoula MN, Zattas D, Seli E, Sakkas D, Lalioti MD. 2010. "Identification and in vitro characterization of follicle stimulating hormone (FSH) receptor variants associated with abnormal ovarian response to FSH." *J Clin Endocrinol Metab*, 95: 529-36.
- [78] Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG. 2008. "Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality." *Hum Reprod Update*, 14: 159-77.
- [79] Gleicher N, Weghofer A, Barad DH. 2011. "The role of androgens in follicle maturation and ovulation induction: friend or foe of infertility treatment?" *Reprod Biol Endocrinol*, 9: 116.
- [80] Gleicher N, Kushnir VA, Albertini DF, Barad DH. 2016. "Improvements in IVF in women of advanced age." *J Endocrinol*, 230: F1-6.
- [81] Gouédard L, Chen YG, Thevenet L, Racine C, Borie S, Lamarre I, Josso N, Massague J, di Clemente N. 2000. "Engagement of bone morphogenetic protein type IB receptor and Smad1 signaling by anti-Müllerian hormone and its type II receptor." *J Biol Chem*, 275: 27973-8.
- [82] Gougeon A, Ecochard R, Thalabard JC. 1994. "Age-related changes of the population of human ovarian follicles: increase in the disappearance rate of non-growing and early-growing follicles in aging women." *Biol Reprod* 50: 653-63.
- [83] Grøndahl ML, Borup R, Lee YB, Myrhøj V, Meinertz H, Sørensen S. 2009. "Differences in gene expression of granulosa cells from women undergoing controlled ovarian hyperstimulation with either recombinant follicle-stimulating hormone or highly purified human menopausal gonadotropin." *Fertil Steril*, 91: 1820-30.
- [84] Grøndahl ML, Nielsen ME, Dal Canto MB, Fadini R, Rasmussen IA, Westergaard LG, Kristensen SG, Yding Andersen C. 2011. "Anti-Müllerian hormone remains highly expressed in human cumulus cells during the final stages of folliculogenesis." *Reprod Biomed Online*, 22: 389-98.

- [85] Grynnerup AG, Lindhard A, Sørensen S. 2014. "Recent progress in the utility of anti-Müllerian hormone in female infertility." *Curr Opin Obstet Gynecol*, 26: 162-7.
- [86] Gupta, SK. 2015. "Role of zona pellucida glycoproteins during fertilization in humans." *J Reprod Immunol* 108: 90-7 .
- [87] Gurunath S, Pandian Z, Anderson RA, Bhattacharya S. 2011. "Defining infertility-a systematic review of prevalence studies." *Hum Reprod Update* 17: 575-88.
- [88] Hammoud I, Vialard F, Casasnovas P, Lefebvre G, Vauthier-Brouzes D, Poirot C. 2008. "How viable are zygotes in which the PN are still intact at 25 hours? Impact on the choice of embryo for transfer." *Fertil Steril*, 90: 551-6.
- [89] Hanrieder J, Nyakas A, Naessén T, Bergquist J. 2008. "Proteomic analysis of human follicular fluid using an alternative bottom-up approach." *J Proteome Res*, 7: 443-9.
- [90] Hansen KR, Knowlton NS, Thyer AC, Charleston JS, Soules MR, Klein NA. 2008. "A new model of reproductive aging: the decline in ovarian non-growing follicle number from birth to menopause." *Hum Reprod* 23: 699-708.
- [91] Hardarson T, Hanson C, Sjögren A, Lundin K. 2001. "Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation." *Hum Reprod*, 16: 313-8.
- [92] Hashiba Y, Asada Y, Heikinheimo O, Lanzendorf SE, Mizutani S. 2001. "Microinjection of antisense c-mos oligonucleotides prevents the progression of meiosis in human and hamster oocytes." *Fertil Steril* 76: 143-7.
- [93] Hayes E, Kushnir V, Ma X, Biswas A, Prizant H, Gleicher N, Sen A. 2016. "Intra-cellular mechanism of Anti-Müllerian hormone (AMH) in regulation of follicular development." *Mol Cell Endocrinol*, 433: 56-65.
- [94] Heemers HV, Tindall DJ. 2007. "Androgen receptor (AR) coregulators: a diversity of functions converging on and regulating the AR transcriptional complex." *Endocr Rev*, 28: 778-808.

- [95] Heikinheimo O, Gibbons WE. 1998. "The molecular mechanisms of oocyte maturation and early embryonic development are unveiling new insights into reproductive medicine." *Mol Hum Reprod* 4: 745-56.
- [96] Heinlein CA, Chang C. 2002. "The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in nongenomic androgen actions." *Mol Endocrinol*, 16: 2181-7.
- [97] Hemmings KE, Maruthini D, Vyjayanthi S, Hogg JE, Balen AH, Campbell BK, Leese HJ, Picton HM. 2013. "Amino acid turnover by human oocytes is influenced by gamete developmental competence, patient characteristics and gonadotrophin treatment." *Hum Reprod*, 28: 1031-44.
- [98] Honnma H, Baba T, Sasaki M, Hashiba Y, Oguri H, Fukunaga T, Endo T, Asada Y. 2013. "Serum anti-Mullerian hormone levels affect the rate of ongoing pregnancy after in vitro fertilization." *Reprod Sci*, 20: 51-9.
- [99] Hoodbhoy T, Talbot P. 1994. "Mammalian cortical granules: contents, fate, and function." *Mol Reprod Dev* 39: 439-48.
- [100] Hörmanseder E, Tischer T, Mayer TU. 2013. "Modulation of cell cycle control during oocyte-to-embryo transitions." *EMBO J* 32: 2191-203.
- [101] Høst E, Gabrielsen A, Lindenberg S, Smidt-Jensen S. 2002. "Apoptosis in human cumulus cells in relation to zona pellucida thickness variation, maturation stage, and cleavage of the corresponding oocyte after intracytoplasmic sperm injection." *Fertil Steril*, 77: 511-5.
- [102] Hull MG, Fleming CF, Hughes AO, McDermott A. 1996. "The age-related decline in female fecundity: a quantitative controlled study of implanting capacity and survival of individual embryos after in vitro fertilization." *Fertil Steril*, 65: 783-90.
- [103] Humblot P, Holm P, Lonergan P, Wrenzycki C, Lequarré AS, Joly CG, Herrmann D, Lopes A, Rizos D, Niemann H, Callesen H. 2005. "Effect of stage of follicular growth during superovulation on developmental competence of bovine oocytes." *Theriogenology* 63: 1149-66.
- [104] Iager AE, Kocabas AM, Otu HH, Ruppel P, Langerveld A, Schnarr P, Suarez M, Jarrett JC, Conaghan J, Rosa GJ, Fernández E, Rawlins RG, Cibelli JB, Crosby

- JA. 2013. "Identification of a novel gene set in human cumulus cells predictive of an oocyte's pregnancy potential." *Fertil Steril*, 99: 745-752.
- [105] Iliodromiti S, Kelsey TW, Wu O, Anderson RA, Nelson SM. 2014. "The predictive accuracy of anti-Müllerian hormone for live birth after assisted conception: a systematic review and meta-analysis of the literature." *Hum Reprod Update*, 20: 560-70.
- [106] Imbeaud S, Faure E, Lamarre I, Mattéi MG, di Clemente N, Tizard R, Carré-Eusèbe D, Belville C, Tragethon L, Tonkin C, Nelson J, McAuliffe M, Bidart JM, Lababidi A, Josso N, Cate RL, Picard JY. 1995. "Insensitivity to anti-müllerian hormone due to a mutation in the human anti-müllerian hormone receptor." *Nat Genet*, 11: 382-8.
- [107] Ingraham HA, Hirokawa Y, Roberts LM, Mellon SH, McGee E, Nachtigal MW, Visser JA. 2000. "Autocrine and paracrine Müllerian inhibiting substance hormone signaling in reproduction." *Recent Prog Horm Res*, 55: 53-67.
- [108] Izzo CR, Monteleone PA, Serafini PC. 2015. "Human reproduction: current status." *Rev Assoc Med Bras (1992)* 61: 557-9.
- [109] Jakimiuk AJ, Weitsman SR, Brzechffa PR, Magoffin DA. 1998. "Aromatase mRNA expression in individual follicles from polycystic ovaries." *Mol Hum Reprod*, 4: 1-8.
- [110] Jamin SP, Arango NA, Mishina Y, Hanks MC, Behringer RR. 2002. "Requirement of Bmpr1a for Müllerian duct regression during male sexual development." *Nat Genet*, 32: 408-10.
- [111] Jeppesen JV, Kristensen SG, Nielsen ME, Humaidan P, Dal Canto M, Fadini R, Schmidt KT, Ernst E, Yding Andersen C. 2012a. "LH-receptor gene expression in human granulosa and cumulus cells from antral and preovulatory follicles." *J Clin Endocrinol Metab*, 97: E1524-31.
- [112] Jeppesen JV, Nielsen ME, Kristensen SG, Yding Andersen C. 2012b. "Concentration of activin A and follistatin in follicular fluid from human small antral follicles associated to gene expression of the corresponding granulosa cells." *Mol Cell Endocrinol*, 356: 48-54.

- [113]Jeppesen JV, Anderson RA, Kelsey TW, Christiansen SL, Kristensen SG, Jayaprakasan K, Raine-Fenning N, Campbell BK, Yding Andersen C. 2013. "Which follicles make the most anti-Müllerian hormone in humans? Evidence for an abrupt decline in AMH production at the time of follicle selection." *Mol Hum Reprod*, 19: 519-27.
- [114]Jiang X, Liu H, Chen X, Chen PH, Fischer D, Sriraman V, Yu HN, Arkinstall S, He X. 2012. "Structure of follicle-stimulating hormone in complex with the entire ectodomain of its receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109: 12491-6.
- [115]Jiang X, Dias JA, He X. 2014. "Structural biology of glycoprotein hormones and their receptors: insights to signaling." *Mol Cell Endocrinol*, 382: 424-51.
- [116]Kar, S. 2012. "Clomiphene citrate or letrozole as first-line ovulation induction drug in infertile PCOS women: A prospective randomized trial." *J Hum Reprod Sci*, 5: 262-5.
- [117]Karakaya C, Guzeloglu-Kayisli O, Hobbs RJ, Gerasimova T, Uyar A, Erdem M, Oktem M, Erdem A, Gumuslu S, Ercan D, Sakkas D, Comizzoli P, Seli E, Lalioti MD. 2014. "Follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) alternative skipping of exon 2 or 3 affects ovarian response to FSH." *Mol Hum Reprod*, 20: 630-43.
- [118]Katsikis I, Kita M, Karkanaki A, Prapas N, Panidis D. 2006. "Anovulation and ovulation induction." *Hippokratia*, 10: 120-7.
- [119]Kaufman OH, Marlow FL. 2016. "Methods to study maternal regulation of germ cell specification in zebrafish." *Methods Cell Biol* (Morgan & Claypool Life Sciences) 134: 1-32.
- [120]Kedem A, Yung Y, Yerushalmi GM, Haas J, Maman E, Hanochi M, Hemi R, Orvieto R, Dor J, Hourvitz A. 2014. "Anti Müllerian Hormone (AMH) level and expression in mural and cumulus cells in relation to age." *J Ovarian Res*, 7: 113.
- [121]Kedem-Dickman A, Maman E, Yung Y, Yerushalmi GM, Hemi R, Hanochi M, Dor J, Hourvitz A. 2012. "Anti-Müllerian hormone is highly expressed and secreted from cumulus granulosa cells of stimulated preovulatory immature and atretic oocytes." *Reprod Biomed Online*, 24: 540-6.

- [122] Kollmann Z, Bersinger NA, McKinnon BD, Schneider S, Mueller MD, von Wolff M. 2015. "Anti-Müllerian hormone and progesterone levels produced by granulosa cells are higher when derived from natural cycle IVF than from conventional gonadotropin-stimulated IVF." *Reprod Biol Endocrinol*, 13: 21.
- [123] Korkmaz C, Tekin YB, Sakinci M, Ercan CM. 2015. "Effects of maternal ageing on ICSI outcomes and embryo development in relation to oocytes morphological characteristics of birefringent structures." *Zygote*, 23: 550-5.
- [124] Kristensen SG, Andersen K, Clement CA, Franks S, Hardy K, Andersen CY. 2014. "Expression of TGF-beta superfamily growth factors, their receptors, the associated SMADs and antagonists in five isolated size-matched populations of pre-antral follicles from normal human ovaries." *Mol Hum Reprod*, 20: 293-308.
- [125] Kushnir MM, Naessén T, Wanggren K, Rockwood AL, Crockett DK, Bergquist J. 2012. "Protein and steroid profiles in follicular fluid after ovarian hyperstimulation as potential biomarkers of IVF outcome." *J Proteome Res* 11: 5090-100.
- [126] La Marca A, Carducci Arterisio A, Stabile G, Rivasi F, Volpe A. 2005. "Evidence for cycle-dependent expression of follicle-stimulating hormone receptor in human endometrium." *Gynecol Endocrinol*, 21: 303-6.
- [127] La Marca A, Grisendi V, Griesinger G. 2013. "How Much Does AMH Really Vary in Normal Women?" *Int J Endocrinol*, 2013: 959487.
- [128] La Marca A, Sunkara SK. 2014. "Individualization of controlled ovarian stimulation in IVF using ovarian reserve markers: from theory to practice." *Hum Reprod Update*, 20: 124-40.
- [129] Lawler C, Baker HW, Edgar DH. 2007. "Relationships between timing of syngamy, female age and implantation potential in human in vitro-fertilised oocytes." *Reprod Fertil Dev*, 19: 482-7.
- [130] Lazaros L, Fotaki A, Pamporaki C, Hatzi E, Kitsou C, Zikopoulos A, Virgiliou C, Kosmas I, Bouba I, Stefos T, Theodoridis G, Georgiou I. 2016. "The ovarian response to standard gonadotropin stimulation is influenced by AMHR II genotypes." *Gynecol Endocrinol*, 32: 641-645.

- [131] Lee MM, Donahoe PK, Hasegawa T, Silverman B, Crist GB, Best S, Hasegawa Y, Noto RA, Schoenfeld D, MacLaughlin DT. 1996. "Mullerian inhibiting substance in humans: normal levels from infancy to adulthood." *J Clin Endocrinol Metab*, 81: 571-6.
- [132] Lee MS, Liu CH, Lee TH, Wu HM, Huang CC, Huang LS, Chen CM, Cheng EH. 2010. "Association of creatin kinase B and peroxiredoxin 2 expression with age and embryo quality in cumulus cells." *J Assist Reprod Genet*, 27: 629-39.
- [133] Lehmann P, Vélez MP, Saumet J, Lapensée L, Jamal W, Bissonnette F, Phillips S, Kadoch IJ. 2014. "Anti-Müllerian hormone (AMH): a reliable biomarker of oocyte quality in IVF." *J Assist Reprod Genet*, 31: 493-8.
- [134] Li HW, Lee VC, Lau EY, Yeung WS, Ho PC, Ng EH. 2014. "Ovarian response and cumulative live birth rate of women undergoing in-vitro fertilisation who had discordant anti-Mullerian hormone and antral follicle count measurements: a retrospective study." *PLoS One*, 9: e108493.
- [135] Li R, Albertini DF. 2013. "The road to maturation: somatic cell interaction and self-organization of the mammalian oocyte." *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14: 141-52.
- [136] Li SH, Lin MH, Hwu YM, Lu CH, Yeh LY, Chen YJ, Lee RK. 2015. "Correlation of cumulus gene expression of GJA1, PRSS35, PTX3, and SERPINE2 with oocyte maturation, fertilization, and embryo development." *Reprod Biol Endocrinol*, 13: 93.
- [137] Liu AX, Zhu YM, Luo Q, Wu YT, Gao HJ, Zhu XM, Xu CM, Huang HF. 2007. "Specific peptide patterns of follicular fluids at different growth stages analyzed by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry." *Biochim Biophys Acta*, 1770: 29-38.
- [138] Liu, M. 2011. "The biology and dynamics of mammalian cortical granules." *Reprod Biol Endocrinol* 9: 149.
- [139] Lu CH, Lee RK, Hwu YM, Lin MH, Yeh LY, Chen YJ, Lin SP, Li SH. 2013. "Involvement of the serine protease inhibitor, SERPINE2, and the urokinase plasminogen activator in cumulus expansion and oocyte maturation." *PLoS One*, 8: e74602.

- [140] Lu YQ, He XC, Zheng P. 2016. "Decrease in expression of maternal effect gene *Mater* is associated with maternal ageing in mice." *Mol Hum Reprod* 22: 252-60.
- [141] Macklon NS, Fauser BC. 1998. "Follicle development during the normal menstrual cycle." *Maturitas* 30: 181-8.
- [142] Maheshwari A, Hamilton M, Bhattacharya S. 2008. "Effect of female age on the diagnostic categories of infertility." *Hum Reprod* 23 :538-42.
- [143] Makar RS, Toth TL. 2002. "The evaluation of infertility." *Am J Clin Pathol* 117: 95-103.
- [144] Marschalek J, Ott J, Husslein H, Kuessel L, Elhenicky M, Mayerhofer K, Franz MB. 2015. "The impact of GnRH agonists in patients with endometriosis on prolactin and sex hormone levels: a pilot study." *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 195: 156-9.
- [145] Massagué J, Chen YG. 2000. "Controlling TGF-beta signaling." *Genes Dev*, 14: 627-44.
- [146] McGee EA, Hsueh AJ. 2000. "Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles." *Endocr Rev*, 21: 200-14.
- [147] McReynolds S, Dzieciatkowska M, McCallie BR, Mitchell SD, Stevens J, Hansen K, Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG. 2012. "Impact of maternal aging on the molecular signature of human cumulus cells." *Fertil Steril*, 98: 1574-80.
- [148] Merhi Z, Buyuk E, Berger DS, Zapantis A, Israel DD, Chua S Jr, Jindal S. 2013. "Leptin suppresses anti-Mullerian hormone gene expression through the JAK2/STAT3 pathway in luteinized granulosa cells of women undergoing IVF." *Hum Reprod*, 28: 1661-9.
- [149] Mescher, LA. 2013. "The Cytoplasm." In *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas. Thirteenth edition*, by Junqueira LCU Mescher LA. New York: McGraw Hill Medical.
- [150] Messinis, IE. 2006. "From menarche to regular menstruation: endocrinological background." *Ann N Y Acad Sci* 1092: 49-56.

- [151] Mishina Y, Rey R, Finegold MJ, Matzuk MM, Josso N, Cate RL, Behringer RR. 1996. "Genetic analysis of the Müllerian-inhibiting substance signal transduction pathway in mammalian sexual differentiation." *Genes Dev*, 10: 2577-87.
- [152] Mohsen IA, El Din RE. 2013. "Minimal stimulation protocol using letrozole versus microdose flare up GnRH agonist protocol in women with poor ovarian response undergoing ICSI." *Gynecol Endocrinol*, 29: 105-8.
- [153] Montag M, Köster M, van der Ven K, van der Ven H. 2011. "Gamete competence assessment by polarizing optics in assisted reproduction." *Hum Reprod Update*, 17: 654-66.
- [154] Montag M, Toth B, Strowitzki T. 2013. "New approaches to embryo selection." *Reprod Biomed Online*, 27: 539-46.
- [155] Mooradian AD, Morley JE, Korenman SG. 1987. "Biological actions of androgens." *Endocr Rev*, 8: 1-28.
- [156] Munné, S. 2006. "Chromosome abnormalities and their relationship to morphology and development of human embryos." *Reprod Biomed Online*, 12: 234-53.
- [157] Navot D, Bergh PA, Williams MA, Garrisi GJ, Guzman I, Sandler B, Grunfeld L. 1991. "Poor oocyte quality rather than implantation failure as a cause of age-related decline in female fertility." *Lancet*, 337: 1375-7.
- [158] Ndiaye K, Fayad T, Silversides DW, Sirois J, Lussier JG. 2005. "Identification of downregulated messenger RNAs in bovine granulosa cells of dominant follicles following stimulation with human chorionic gonadotropin." *Biol Reprod*, 73: 324-33.
- [159] Nelson SM, Yates RW, Lyall H, Jamieson M, Traynor I, Gaudoin M, Mitchell P, Ambrose P, Fleming R. 2009. "Anti-Müllerian hormone-based approach to controlled ovarian stimulation for assisted conception." *Hum Reprod*, 24: 867-75.
- [160] Nel-Themaat L, Nagy ZP. 2011. "A review of the promises and pitfalls of oocyte and embryo metabolomics." *Placenta*, 32: S257-63.
- [161] Nielsen EM, Rasmussen IA, Fukuda M, Westergaard LG, Yding Andersen C. 2010. "Concentrations of anti-Müllerian hormone in fluid from small human antral

follicles show a negative correlation with CYP19 mRNA expression in the corresponding granulosa cells." *Mol Hum Reprod*, 16: 637-43.

- [162]Nielsen ME, Rasmussen IA, Kristensen SG, Christensen ST, Møllgård K, Wreford Andersen E, Byskov AG, Yding Andersen C. 2011. "In human granulosa cells from small antral follicles, androgen receptor mRNA and androgen levels in follicular fluid correlate with FSH receptor mRNA." *Mol Hum Reprod*, 17: 63-70.
- [163]Norris RP, Freudzon M, Mehlmann LM, Cowan AE, Simon AM, Paul DL, Lampe PD, Jaffe LA. 2008. "Luteinizing hormone causes MAP kinase-dependent phosphorylation and closure of connexin 43 gap junctions in mouse ovarian follicles: one of two paths to meiotic resumption." *Development* 135: 3229-38.
- [164]Nyboe Andersen A, Goossens V, Bhattacharya S, Ferraretti AP, Kupka MS, de Mouzon J, Nygren KG, The European IVF-monitoring (EIM) Consortium for the ESHRE. 2009. "Assisted reproductive technology and intrauterine inseminations in Europe, 2005: results generated from European registers by ESHRE." *Hum Reprod*, 24: 1267-87.
- [165]Ola SI, Sun QY. 2012. "Factors influencing the biochemical markers for predicting mammalian oocyte quality." *J Reprod Dev*, 58: 385-92.
- [166]Orvieto R, Nahum R, Rabinson J, Ashkenazi J, Anteby EY, Meltcer S. 2009. "Follitropin-alpha (Gonal-F) versus follitropin-beta (Puregon) in controlled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization: is there any difference?" *Fertil Steril*, 91: 1522-5.
- [167]Osman, A. 2012. "MicroRNAs in health and disease--basic science and clinical applications." *Clin Lab*, 58: 393-402.
- [168]Otoi T, Fujii M, Tanaka M, Ooka A, Suzuki T. 2000. "Oocyte diameter in relation to meiotic competence and sperm penetration." *Theriogenology*, 54: 535-42.
- [169]Oyawoye O, Abdel Gadir A, Garner A, Constantinovici N, Perrett C, Hardiman P. 2003. "Antioxidants and reactive oxygen species in follicular fluid of women undergoing IVF: relationship to outcome." *Hum Reprod*, 18: 2270-4.

- [170] Pacchiarotti A, Selman H, Valeri C, Napoletano S, Sbracia M, Antonini G, Biagiotti G, Pacchiarotti A. 2016. "Ovarian Stimulation Protocol in IVF: An Up-to-Date Review of the Literature." *Curr Pharm Biotechnol*, 17: 303-15.
- [171] Pan Z, Zhang J, Lin F, Ma X, Wang X, Liu H. 2012. "Expression profiles of key candidate genes involved in steroidogenesis during follicular atresia in the pig ovary." *Mol Biol Rep*, 39: 10823-32.
- [172] Papale L, Fiorentino A, Montag M, Tomasi G. 2012. "The zygote." *Hum Reprod* 27: i22-49.
- [173] Picard JY, Benarous R, Guerrier D, Josso N, Kahn A. 1986. "Cloning and expression of cDNA for anti-müllerian hormone." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83: 5464-8.
- [174] Pierce JG, Parsons TF. 1981. "Glycoprotein hormones: structure and function." *Annu Rev Biochem*, 50: 465-95.
- [175] Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. 2006. "Effectiveness and treatment for unexplained infertility." *Fertil Steril* 86: S111-4.
- [176] Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. 2013. "Use of clomiphene citrate in infertile women: a committee opinion." *Fertil Steril*, 100: 341-8.
- [177] Prados FJ, Debrock S, Lemmen JG, Agerholm I. 2012. "The cleavage stage embryo." *Hum Reprod*, 27: i50-71.
- [178] Prizant H, Gleicher N, Sen A. 2014. "Androgen actions in the ovary: balance is key." *J Endocrinol*, 222: R141-51.
- [179] Radu A, Pichon C, Camparo P, Antoine M, Allory Y, Couvelard A, Fromont G, Hai MT, Ghinea N. 2010. "Expression of follicle-stimulating hormone receptor in tumor blood vessels." *N Engl J Med*, 363: 1621-30.
- [180] Rajpert-De Meyts E, Jørgensen N, Graem N, Müller J, Cate RL, Skakkebaek NE. 1999. "Expression of anti-Müllerian hormone during normal and pathological gonadal development: association with differentiation of Sertoli and granulosa cells." *J Clin Endocrinol Metab*, 84: 3836-44.

- [181]Rice S, Ojha K, Whitehead S, Mason H. 2007. "Stage-specific expression of androgen receptor, follicle-stimulating hormone receptor, and anti-Müllerian hormone type II receptor in single, isolated, human preantral follicles: relevance to polycystic ovaries." *J Clin Endocrinol Metab*, 92: 1034-40.
- [182]Rienzi L, Ubaldi FM, Iacobelli M, Minasi MG, Romano S, Ferrero S, Sapienza F, Baroni E, Litwicka K, Greco E. 2008. "Significance of metaphase II human oocyte morphology on ICSI outcome." *Fertil Steril*, 90: 1692-700.
- [183]Rienzi LF, Ubaldi FM. 2009. "Oocyte retrieval and selection." In *Textbook of assisted reproductive techniques: laboratory and clinical perspectives*, by Weissman A, Howles CM, Shoham Z Gardner DK, 85-103. London: Informa Healthcare.
- [184]Rienzi L, Balaban B, Ebner T, Mandelbaum J. 2012. "The oocyte." *Hum Reprod* 27: 2-21.
- [185]Roberts R, Franks S, Hardy K. 2002. "Culture environment modulates maturation and metabolism of human oocytes." *Hum Reprod*, 17: 2950-6.
- [186]Romão GS, Araújo MC, de Melo AS, de Albuquerque Salles Navarro PA, Ferriani RA, Dos Reis RM. 2010. "Oocyte diameter as a predictor of fertilization and embryo quality in assisted reproduction cycles." *Fertil Steril*, 93: 621-5.
- [187]Roth LW, McCallie B, Alvero R, Schoolcraft WB, Minjarez D, Katz-Jaffe MG. 2014. "Altered microRNA and gene expression in the follicular fluid of women with polycystic ovary syndrome." *J Assist Reprod Genet*, 31: 355-62.
- [188]Roy AK, Lavrovsky Y, Song CS, Chen S, Jung MH, Velu NK, Bi BY, Chatterjee B. 1999. "Regulation of androgen action." *Vitam Horm*, 55: 309-52.
- [189]Ruan W, Lai M. 2007. "Actin, a reliable marker of internal control?" *Clin Chim Acta*, 385: 1-5.
- [190]Ruvolo G, Fattouh RR, Bosco L, Brucculeri AM, Cittadini E. 2013. "New molecular markers for the evaluation of gamete quality." *J Assist Reprod Genet*, 30: 207-12.
- [191]Sadler, TW. 2008. *Langmanova medicinska embriologija*. Zagreb: Školska knjiga.

- [192] Salmon NA, Handyside AH, Joyce IM. 2004. "Oocyte regulation of anti-Müllerian hormone expression in granulosa cells during ovarian follicle development in mice." *Dev Biol*, 266: 201-8.
- [193] Sánchez F, Adriaenssens T, Romero S, Smits J. 2010. "Different follicle-stimulating hormone exposure regimens during antral follicle growth alter gene expression in the cumulus-oocyte complex in mice." *Biol Reprod*, 83: 514-24.
- [194] Schimberni M, Ciardo F, Schimberni M, Giallonardo A, De Pratti V, Sbracia M. 2016. "Short gonadotropin-releasing hormone agonist versus flexible antagonist versus clomiphene citrate regimens in poor responders undergoing in vitro fertilization: a randomized controlled trial." *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 20: 4354-4361.
- [195] Schweigert FJ, Gericke B, Wolfram W, Kaisers U, Dudenhausen JW. 2006. "Peptide and protein profiles in serum and follicular fluid of women undergoing IVF." *Hum Reprod* 21: 2960-8.
- [196] Seifer DB, MacLaughlin DT, Christian BP, Feng B, Shelden RM. 2002. "Early follicular serum müllerian-inhibiting substance levels are associated with ovarian response during assisted reproductive technology cycles." *Fertil Steril*, 77: 468-71.
- [197] Seifer DB, MacLaughlin DT. 2007. "Mullerian Inhibiting Substance is an ovarian growth factor of emerging clinical significance." *Fertil Steril*, 88: 539-46.
- [198] Seli E, Babayev E, Collins SC, Nemeth G, Horvath TL. 2014. "Minireview: Metabolism of female reproduction: regulatory mechanisms and clinical implications." *Mol Endocrinol*, 28: 790-804.
- [199] Silvestre F, Boni R, Fissore RA, Tosti E. 2011. "Ca²⁺ signaling during maturation of cumulus-oocyte complex in mammals." *Mol Reprod Dev* 78: 744-56.
- [200] Simerman AA, Hill DL, Grogan TR, Elashoff D, Clarke NJ, Goldstein EH, Manriquez AN, Chazenbalk GD, Dumesic DA. 2015. "Intrafollicular cortisol levels inversely correlate with cumulus cell lipid content as a possible energy source during oocyte meiotic resumption in women undergoing ovarian stimulation for in vitro fertilization." *Fertil Steril*, 103: 249-57.

- [201] Simoni M, Gromoll J, Nieschlag E. 1997. "The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology." *Endocr Rev*, 18: 739-73.
- [202] Sinisi AA, Pasquali D, Notaro A, Bellastella A. 2003. "Sexual differentiation." *J Endocrinol Invest*, 26: 23-8.
- [203] Sirard MA, Richard F, Blondin P, Robert C. 2006. "Contribution of the oocyte to embryo quality." *Theriogenology* 65: 126-36.
- [204] Smith, GD. 2001. "In vitro maturation of oocytes." *Curr Womens Health Rep*, 1: 143-51.
- [205] Sowers MR, Eyvazzadeh AD, McConnell D, Yosef M, Jannausch ML, Zhang D, Harlow S, Randolph JF Jr. 2008. "Anti-mullerian hormone and inhibin B in the definition of ovarian aging and the menopause transition." *J Clin Endocrinol Metab*, 93: 3478-83.
- [206] Speroff, L. 1994. "The effect of aging on fertility." *Curr Opin Obstet Gynecol*, 6: 115-20.
- [207] Stensen MH, Tanbo T, Storeng R, Byholm T, Fèdorcsak P. 2010. "Routine morphological scoring systems in assisted reproduction treatment fail to reflect age-related impairment of oocyte and embryo quality." *Reprod Biomed Online*, 21: 118-25.
- [208] Sunkara SK, Coomarasamy A, Faris R, Braude P, Khalaf Y. 2014. "Long gonadotropin-releasing hormone agonist versus short agonist versus antagonist regimens in poor responders undergoing in vitro fertilization: a randomized controlled trial." *Fertil Steril*, 101: 147-53.
- [209] Susor A, Jansova D, Anger M, Kubelka M. 2016. "Translation in the mammalian oocyte in space and time." *Cell Tissue Res*, 363: 69-84.
- [210] Sutton-McDowall ML, Gilchrist RB, Thompson JG. 2010. "The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence." *Reproduction*, 139: 685-95.

- [211] Swain JE, Smith GD. 2007. "Reversible phosphorylation and regulation of mammalian oocyte meiotic chromatin remodeling and segregation." *Soc Reprod Fertil Suppl* 63: 343-58.
- [212] Swain JE, Pool TB. 2008. "ART failure: oocyte contributions to unsuccessful fertilization." *Hum Reprod Update* 14: 431-46.
- [213] Takahashi C, Fujito A, Kazuka M, Sugiyama R, Ito H, Isaka K. 2008. "Anti-Müllerian hormone substance from follicular fluid is positively associated with success in oocyte fertilization during in vitro fertilization." *Fertil Steril*, 89: 586-91.
- [214] Takahashi M, Koide SS, Donahoe PK. 1986. "Müllerian inhibiting substance as oocyte meiosis inhibitor." *Mol Cell Endocrinol*, 47: 225-34.
- [215] Talbot P, Dandekar P. 2003. "Perivitelline space: does it play a role in blocking polyspermy in mammals?" *Microsc Res Tech* 61: 349-57.
- [216] Tan TY, Lau SK, Loh SF, Tan HH. 2014. "Female ageing and reproductive outcome in assisted reproduction cycles." *Singapore Med J*, 55: 305-9.
- [217] Tejera A, Herrero J, de Los Santos MJ, Garrido N, Ramsing N, Meseguer M. 2011. "Oxygen consumption is a quality marker for human oocyte competence conditioned by ovarian stimulation regimens." *Fertil Steril*, 96: 618-623.
- [218] Tesarik J, Mendoza C. 1997. "Direct non-genomic effects of follicular steroids on maturing human oocytes: oestrogen versus androgen antagonism." *Hum Reprod Update*, 3: 95-100.
- [219] Tomashov-Matar R, Levi M, Shalgi R. 2008. "The involvement of Src family kinases (SFKs) in the events leading to resumption of meiosis." *Mol Cell Endocrinol* 282: 56-62.
- [220] Tong ZB, Gold L, Pfeifer KE, Dorward H, Lee E, Bondy CA, Dean J, Nelson LM. 2000. "Mater, a maternal effect gene required for early embryonic development in mice." *Nat Genet* 26: 267-8.
- [221] Tramišak Milaković T, Panić Horvat L, Čavlović K, Smiljan Severinski N, Vlašić H, Vlastelić I, Ljiljak D, Radojčić Badovinac A. 2015. "Follicular fluid anti-Müllerian hormone: a predictive marker of fertilization capacity of MII oocytes." *Arch Gynecol Obstet* 291: 681-7.

- [222] Trapman J, Klaassen P, Kuiper GG, van der Korput JA, Faber PW, van Rooij HC, Geurts van Kessel A, Voorhorst MM, Mulder E, Brinkmann AO. 1988. "Cloning, structure and expression of a cDNA encoding the human androgen receptor." *Biochem Biophys Res Commun*, 153: 241-8.
- [223] Tsafrir A, Haimov-Kochman R, Margalioth EJ, Eldar-Geva T, Gal M, Bdolah Y, Imbar T, Hurwitz A, Ben-Chetrit A, Goldberg D. 2015. "Ovarian stimulation for oocyte cryopreservation for prevention of age-related fertility loss: one in five is a low responder." *Gynecol Endocrinol*, 31: 779-82.
- [224] Twigt J, Steegers-Theunissen RP, Bezstarosti K, Demmers JA. 2012. "Proteomic analysis of the microenvironment of developing oocytes." *Proteomics*, 12: 1463-71.
- [225] Uyar A, Torrealday S, Seli E. 2013. "Cumulus and granulosa cell markers of oocyte and embryo quality." *Fertil Steril*, 99: 979-97.
- [226] van Rooij IA, Broekmans FJ, te Velde ER, Fauser BC, Bancsi LF, de Jong FH, Themmen AP. 2002. "Serum anti-Müllerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve." *Hum Reprod*, 17: 3065-71.
- [227] Van Royen E, Mangelschots K, De Neubourg D, Valkenburg M, Van de Meerssche M, Ryckaert G, Eestermans W, Gerris J. 1999. "Characterization of a top quality embryo, a step towards single-embryo transfer." *Hum Reprod* 2345-9.
- [228] Van Royen E, Mangelschots K, De Neubourg D, Laureys I, Ryckaert G, Gerris J. 2001. "Calculating the implantation potential of day 3 embryos in women younger than 38 years of age: a new model." *Hum Reprod*, 16: 326-32.
- [229] Van Royen E, Mangelschots K, Vercruyssen M, De Neubourg D, Valkenburg M, Ryckaert G, Gerris J. 2003. "Multinucleation in cleavage stage embryos." *Hum Reprod*, 18: 1062-9.
- [230] Vendola KA, Zhou J, Adesanya OO, Weil SJ, Bondy CA. 1998. "Androgens stimulate early stages of follicular growth in the primate ovary." *J Clin Invest*, 101: 2622-9.

- [231] Visser JA, Olaso R, Verhoef-Post M, Kramer P, Themmen AP, Ingraham HA. 2001. "The serine/threonine transmembrane receptor ALK2 mediates Müllerian inhibiting substance signaling." *Mol Endocrinol*, 15: 936-45.
- [232] Visser JA, Themmen AP. 2005. "Anti-Müllerian hormone and folliculogenesis." *Mol Cell Endocrinol*, 234: 81-6.
- [233] Visser JA, Durlinger AL, Peters IJ, van den Heuvel ER, Rose UM, Kramer P, de Jong FH, Themmen AP. 2007. "Increased oocyte degeneration and follicular atresia during the estrous cycle in anti-Müllerian hormone null mice." *Endocrinology*, 148: 2301-8.
- [234] Wallace M, Cottell E, Gibney MJ, McAuliffe FM, Wingfield M, Brennan L. 2012. "An investigation into the relationship between the metabolic profile of follicular fluid, oocyte developmental potential, and implantation outcome." *Fertil Steril*, 97: 1078-84.
- [235] Walters KA, Allan CM, Jimenez M, Lim PR, Davey RA, Zajac JD, Illingworth P, Handelsman DJ. 2007. "Female mice haploinsufficient for an inactivated androgen receptor (AR) exhibit age-dependent defects that resemble the AR null phenotype of dysfunctional late follicle development, ovulation, and fertility." *Endocrinology*, 148: 3674-84.
- [236] Walters KA, Simanainen U, Handelsman DJ. 2010. "Molecular insights into androgen actions in male and female reproductive function from androgen receptor knockout models." *Hum Reprod Update*, 16: 543-58.
- [237] Warzych E, Pers-Kamczyc E, Krzywak A, Dudzińska S, Lechniak D. 2013. "Apoptotic index within cumulus cells is a questionable marker of meiotic competence of bovine oocytes matured in vitro." *Reprod Biol*, 13: 82-7.
- [238] Wathlet S, Adriaenssens T, Segers I, Verheyen G, Van de Velde H, Coucke W, Ron El R, Devroey P, Smits J. 2011. "Cumulus cell gene expression predicts better cleavage-stage embryo or blastocyst development and pregnancy for ICSI patients." *Hum Reprod*, 26: 1035-51.
- [239] Wathlet S, Adriaenssens T, Segers I, Verheyen G, Janssens R, Coucke W, Devroey P, Smits J. 2012. "New candidate genes to predict pregnancy outcome

in single embryo transfer cycles when using cumulus cell gene expression.” *Fertil Steril*, 98: 432-9.

- [240] Wathlet S, Adriaenssens T, Segers I, Verheyen G, Van Landuyt L, Coucke W, Devroey P, Smits J. 2013. “Pregnancy prediction in single embryo transfer cycles after ICSI using QPCR: validation in oocytes from the same cohort.” *PLoS One*, 8: e54226.
- [241] Weenen C, Laven JS, Von Bergh AR, Cranfield M, Groome NP, Visser JA, Kramer P, Fauser BC, Themmen AP. 2004. “Anti-Müllerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment.” *Mol Hum Reprod*, 10: 77-83.
- [242] Weil S, Vendola K, Zhou J, Bondy CA. 1999. “Androgen and follicle-stimulating hormone interactions in primate ovarian follicle development.” *J Clin Endocrinol Metab*, 84: 2951-6.
- [243] Wilson CA, di Clemente N, Ehrenfels C, Pepinsky RB, Josso N, Vigier B, Cate RL. 1993. “Müllerian inhibiting substance requires its N-terminal domain for maintenance of biological activity, a novel finding within the transforming growth factor-beta superfamily.” *Mol Endocrinol*, 7: 247-57.
- [244] Wilson CM, McPhaul MJ. 1994. “A and B forms of the androgen receptor are present in human genital skin fibroblasts.” *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91: 1234-8.
- [245] Wunder DM, Guibourdenche J, Birkhäuser MH, Bersinger NA. 2008. “Anti-Müllerian hormone and inhibin B as predictors of pregnancy after treatment by in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection.” *Fertil Steril*, 90: 2203-10.
- [246] Yates AP, Rustamov O, Roberts SA, Lim HY, Pemberton PW, Smith A, Nardo LG. 2011. “Anti-Müllerian hormone-tailored stimulation protocols improve outcomes whilst reducing adverse effects and costs of IVF.” *Hum Reprod*, 26: 2353-62.
- [247] Yding Andersen C, Rosendahl M, Byskov AG. 2008. “Concentration of anti-Müllerian hormone and inhibin-B in relation to steroids and age in follicular fluid from small antral human follicles.” *J Clin Endocrinol Metab*, 93: 2344-9.

- [248] Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, Sullivan E, Vanderpoel S. 2009. "International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009." *Fertil Steril* 92 :1520-4.

8. POPIS KRATICA

AFC	broj antralnih folikula
AMH	Anti-Müllerov hormon
AMHR2	receptor anti-Müllerovog hormona tipa dva
AR	receptor androgena
ATP	adenozin trifosfat
BMP	koštani morfogenetski proteini
cAMP	ciklički adenzin monofosfat
cDNA	komplementarna deoksiribonukleinska kiselina
COC	kompleks kumulusa i oocyte
DNaza	deoksiribonukleaza
dNTP	eng. <i>deoxy nucleoside triphosphate</i>
ELISA	eng. <i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ET	prijenos zametka
FF	folikularna tekućina
ff AMH	Anti-Müllerov hormon u folikularnoj tekućini
FSH	folikulostimulirajući hormon
FSHR	receptor folikulostimulirajućeg hormona
GIFT	eng. <i>gamete intrafallopian transfer</i>
GnRH	gonadotropin otpuštajući hormon
GPCR	G-protein spregnuti receptori
GV	germinalna vezikula
hCG	humani korionski gonadotropin
HSP	proteini toplinskog šoka
ICM	unutrašnja stanična masa
ICSI	eng. <i>intracytoplasmatic sperm injection</i>
IGF-1	inzulinu sličan 131actor rasta jedan
IVF	eng. <i>in vitro fertilisation</i>
KOH	kontrolirana ovarijska hiperstimulacija
LH	luteinizirajući hormon
miRNA	mikro ribonukleinska kiselina
MPF	čimbenik promicanja M faze
MPO	medicinski pomognuta oplodnja

MS	masena spektrometrija
NF	eng. <i>non fertilised</i>
NPB	nukleolarna prekursorska tjelešca
PB	polarno tijelo
PCR	lančana reakcija polimerazom
PN	pronukleus
PVS	perivitelini prostor
RNaza	ribonukleaza
RNS	reaktivni dušikovi radikali
ROS	reaktivni kisikovi radikali
RT-PCR	lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu
sER	glatki endoplazmatski retikulum
βME	beta merkaptioetanol
TE	trofoektoderm
TGFβ	transformirajući faktor beta
TSH	tireotropin
ZIFT	eng. <i>zygote intrafallopian transfer</i>
ZP	zona pelucida

9. POPIS ILUSTRACIJA

SLIKE

Slika 1. Prikaz građe zrele jajne stanice.

Slika 2. Razvojni stadiji folikula tijekom folikulogeneze.

Slika 3. Oogeneza – proces razvoja jajne stanice.

Slika 4. Usporedba morfologije MII, PI i MI oocite.

Slika 5. Izdvojene morfološke abnormalnosti oocite.

Slika 6. Zigota idealne morfologije s pravilno centralno postavljenim PN-ima normalne veličine, s idealno smještenim NPB-ima adekvatnog broja i veličine te s normalnom citoplazmom.

Slika 7. Morfološki optimalni embrij 2. i 3. dana.

Slika 8. Trodimenzionalni model C-terminalne domene AMH.

Slika 9. Prikaz sazrijevanja i signaliziranja AMH putem receptora tipa 1 i 2.

Slika 10. Planirana metodologija istraživanja s vremenskom linijom izvođenja.

Slika 11. Ogledni primjer MII i MI oocite.

Slika 12. Ogledni primjer morfološki različito ocjenjenih MII oocita.

Slika 13. Ogledni primjer morfološki različito ocjenjenih zigota.

Slika 14. Ogledni primjer morfološki različito ocjenjenih embrija 3. dana.

Slika 15. Ogledni primjer elektroforeze na agaroznom gelu provedene na dva različita uzorka s jasno vidljive dvije linije: 28S i 18S rRNA u omjeru 2:1.

Slika 16. Ogledni primjer prikaza amplifikacijskih krivulja 15 uzoraka stanica kumulusa, u duplikatu, za AMH - gen, obje endogene kontrole (GAPDH i β -aktin) i tri negativne kontrole.

Slika 17. Ogledni primjer prikaza relativne ekspresije AMH - gena u 15 uzoraka stanica kumulusa (normalizirane pomoću endogenih kontrola GAPDH i β -aktin).

Slika 18. Kalibracijska krivulja izvedena od 6 kalibratora poznatih koncentracija, uključenih u ELISA - test, na temelju koje su određene vrijednosti AMH - koncentracije uzoraka.

Slika 19. Razlika u koncentracijama ff AMH između skupina pacijentica životne dobi < 35 i ≥ 35.

Slika 20. Razlika u koncentracijama ff AMH između skupina podvrgnutih različitim protokolima hormonske stimulacije.

Slika 21. ΔC_t vrijednosti AMH - gena i AR - gena statistički su značajno više u stanicama kumulusa koje okružuju oocite optimalne morfologije u odnosu na oocite suboptimalne morfologije.

Slika 22. Pravci regresije s jednadžbom pravca i koeficijentom korelacije (r) za sve postojeće kombinacije ispitivanih varijabli.

TABLICE

Tablica 1. Ukupan broj uzoraka uključenih u istraživanje.

Tablica 2. Procjena zrelosti oocite.

Tablica 3. Ocjenjivanje MII oocita.

Tablica 4. Ocjenjivanje zigota.

Tablica 5. Ocjenjivanje embrija starosti 3 dana.

Tablica 6. Raspodjela oocita, zigota i embrija na temelju morfoloških ocjena.

Tablica 7. Srednje C_t i ΔC_t vrijednosti gena AMH, AMHR2, FSHR i AR dobivene normalizacijom endogenim kontrolama (GAPDH i β -aktin).

Tablica 8. Koncentracije AMH u folikularnoj tekućini.

Tablica 9. Morfologija oocita, zigota i embrija pacijentica mlađih od 35 godina i pacijentica starih 35 godina i više.

Tablica 10. ΔC_t vrijednosti gena AMH, AMHR2, FSHR i AR pacijentica mlađih od 35 godina i pacijentica starih 35 godina i više.

Tablica 11. Morfologija oocita, zigota i embrija dobivenih od pacijentica liječenih u modificiranom prirodnom ciklusu i uz različite protokole hormonske stimulacije.

Tablica 12. Δ Ct vrijednosti gena AMH, AMHR2, FSHR i AR u stanicama kumulusa dobivenih od pacijentica stimuliranih različitim hormonskim protokolima.

Tablica 13. Promjene genskih ekspresija AMH, AMHR2, FSHR i AR u stanicama kumulusa oocita optimalne (n = 107), odnosno suboptimalne morfologije (n = 22).

Tablica 14. Promjene genskih ekspresija AMH, AMHR2, FSHR i AR u stanicama kumulusa oocita od kojih su se razvile zigote optimalne (n = 73), odnosno suboptimalne morfologije (n = 44).

Tablica 15. Promjene genskih ekspresija AMH, AMHR2, FSHR i AR u stanicama kumulusa oocita od kojih su nastali embriji optimalne (n = 29), odnosno suboptimalne morfologije (n = 73).

Tablica 16. Promjene genskih ekspresija AMH, AMHR2, FSHR i AR u stanicama kumulusa oocita koje su rezultirale izvođenjem ET te trudnoćom.

Tablica 17. Koncentracije AMH u folikularnoj tekućini s obzirom na morfologiju jajne stanice, zigote i embrija te ishod medicinski pomognute oplodnje, odnosno obavljanje ET i utvrđivanje biokemijske trudnoće.

Tablica 18. Povezanost koncentracije AMH u folikularnoj tekućini i genske ekspresije AMH, AMHR2, FSHR i AR u pripadajućim stanicama kumulusa.

Tablica 19. Korelacije između genskih ekspresija AMH, AMHR2, FSHR i AR.

10. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI

Ime i prezime	Sanja Dević Pavlić
Adresa	Markovići 20/5, 51000 Rijeka, Hrvatska
E-pošta	sanja.devic@uniri.hr
Datum rođenja	04. listopada 1982.
Mjesto rođenja	Rijeka, Hrvatska

RADNO ISKUSTVO

- 2013. - Sveučilište u Rijeci, Odjel za biotehnologiju
Radmile Matejčić 2, 51000 Rijeka, Hrvatska
Znanstveni novak - asistent
- 2009. – 2013. Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci
Braće Branchetta 20/1, 51000 Rijeka, Hrvatska
Znanstveni novak - asistent
- 2008. – 2009. Roche d.o.o.
Ulica grada Vukovara 269a, 10000 Zagreb, Hrvatska
Stručni suradnik na terenu
- 2006. – 2008. "Oktal Pharma" d.o.o.
Utinjska 40, 10020 Zagreb, Hrvatska
Stručni suradnik u Službi marketinga

OBRAZOVANJE

- 2010. - Sveučilište u Rijeci, Odjel za biotehnologiju
Poslijediplomski studij „Medicinska kemija“
- 2001. – 2006. Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci
Studij za diplomirane sanitarne inženjere

ZNANSTVENI RADOVI

1. Flego V, Ristić S, Dević Pavlić S, Matanić Lender D, Bulat-Kardum L, Kapović M, Radojčić Badovinac A. Tumor necrosis factor-alpha gene promoter -308 and -238 polymorphisms in patients with lung cancer as a second primary tumor. *Med Sci Monit.* 2013 Oct 11;19:846-51.
2. Dević Pavlić S, Ristić S, Flego V, Kapović M, Radojčić Badovinac A. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion gene polymorphism in lung cancer patients. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2012 Jul;16(7):722-5.

SUDJELOVANJE NA KONGRESIMA

1. Međunarodni kongres „11th Balkan Congress of Human Genetics“; Beograd, Srbija, 17. – 20. rujna 2015. Poster prezentacija: „Association with melanoma of a polymorphic GGC repeat in the NPAS2 gene“; Franzoni A, Markova-Car E, Dević Pavlić S, Jurišić D, Puppini C, Fabbro D, Mio C, De Luca M, Petruz G, Kraljević Pavelić S, Damante G.
2. Međunarodni kongres „9th ISABS Conference on Forensic and Anthropologic Genetics and Mayo Clinic Lectures in Individualized Medicine“; Bol, Brač, 22. – 26. lipnja 2015. Poster prezentacija: „A polymorphic GGC repeat in the NPAS2 gene and its association with melanoma“; Dević Pavlić S, Markova Car E, Jurišić D, Franzoni A, Puppini C, De Luca M, Petruz G, Radojčić Badovinac A, Damante G, Kraljević Pavelić S.
3. Međunarodni kongres „European Human Genetics Conference“; Glasgow, Škotska, 6. – 9. lipnja 2015. Poster prezentacija: „A polymorphic GGC repeat in the NPAS2 gene and its association with melanoma“; Franzoni A, Markova Car E, Dević Pavlić S, Jurišić D, Puppini C, Mio C, De Luca M, Petruz G, Kraljević Pavelić S, Damante G.
4. Međunarodni kongres „1st Euro-Asian Melanoma Congress in BiH“; Sarajevo, BiH, 18. -21. rujna 2014. Poster prezentacija: „Circadian gene polymorphisms in melanoma personalized medicine approach“; Jurišić D, Kraljević Pavelić S, Dević Pavlić S, Markova-Car E.
5. Međunarodni kongres „10th Balkan congress of human genetics and 2nd Alpe Adria meeting of human genetics“; Bled, Slovenija, 10. – 12. listopada 2013. Poster prezentacija: „Tumor necrosis factor-alpha gene promoter -308 and -238

polymorphisms in patients with lung cancer as a second primary tumor“; Dević Pavlić S, Flego V, Ristić S, Radojčić Badovinac A.

6. Međunarodni kongres „7th ISABS Conference in Forensic, Anthropologic and Medical Genetics and Mayo Clinic Lectures in Translational Medicine“; Bol, Brač, 20. – 24. lipnja 2011. Satellite event: “5th Croatian Human Genetics Conference“. Usmeno izlaganje: „ACE I/D polymorphism in lung malignancy“; Dević S, Flego V, Ristić S, Kapović M, Radojčić Badovinac A. Poster prezentacija: „Impact of CPLA2 and COX-2 gene polymorphisms on attenuated niacin skin-flush response in patients with schizophrenia“; Nadalin S, Jonovska S, Rubeša G, Dević S, Buretić-Tomljanović A.
7. Kongres „10th Congress of the Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology“; Opatija, 15. – 18. rujan 2010.